

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller

**Identifizierung von Gbp2p und Hrb1p
als am nukleären mRNA-Export beteiligte Proteine
und Analyse der zytoplasmatischen Umstrukturierungen
exportierter mRNA-Proteinkomplexe**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt



von
Merle Windgassen
aus Wuppertal

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am 03.02.2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch
Referent: Prof. Dr. Rolf Müller
Korreferent: PD Dr. Stephan Becker

meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| 1. Zusammenfassung | 1 |
| 2. Einleitung | 2 |
| 2.1 Nukleo-zytoplasmatischer Kontakt durch Kernporenkomplexe | 2 |
| 2.2 Karyopherin-vermittelter Kerntransport | 3 |
| 2.3 Nukleärer Export von mRNA | 6 |
| 2.4 SR-Proteine und das SR-ähnliche Protein Npl3p | 12 |
| 2.5 Ziele der vorliegenden Arbeit | 15 |
| 3. Material und Methoden | 16 |
| 3.1 Geräte | 16 |
| 3.2 Chemikalien | 17 |
| 3.3 Stämme | 18 |
| 3.3.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme | 18 |
| 3.3.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme | 18 |
| 3.4 Plasmide | 21 |
| 3.5 Oligonukleotide | 22 |
| 3.6 Enzyme und Antikörper | 24 |
| 3.7 Reaktions- und Nachweissysteme | 25 |
| 3.8 Computerprogramme und Datenbanken | 25 |
| 3.9 Kultivierung von Bakterien und Hefen | 26 |
| 3.9.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> | 26 |
| 3.9.2 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> | 27 |
| 3.10 Methoden zur <i>in vitro</i> -Rekombination von DNA | 29 |
| 3.10.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 29 |
| 3.10.1.1 Analytische Präparation von Plasmid-DNA | 29 |
| 3.10.1.2 Quantitative Säulenpräparation von Plasmid-DNA | 29 |
| 3.10.2 Konzentrationsbestimmung von DNA | 30 |
| 3.10.3 Polymerasekettenreaktion | 30 |
| 3.10.3.1 Standard-PCR-Reaktion | 30 |
| 3.10.3.2 „Touchdown“-PCR-Reaktion | 31 |
| 3.10.4 DNA-Reinigung | 31 |
| 3.10.5 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen | 32 |

| | |
|--|----|
| 3.10.6 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden | 32 |
| 3.10.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA | 32 |
| 3.10.8 Elution von DNA aus Agarosegelen | 33 |
| 3.10.9 Ligation von DNA-Fragmenten | 33 |
| 3.10.10 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA | 33 |
| 3.10.11 DNA-Sequenzierung | 34 |
| 3.10.12 Konstruktion der verwendeten Plasmide | 34 |
| 3.11 Arbeiten mit <i>S. cerevisiae</i> | 36 |
| 3.11.1 Transformation mit Plasmid-DNA | 36 |
| 3.11.2 Isolierung von chromosomaler DNA | 36 |
| 3.11.3 Isolierung von Gesamt-RNA | 37 |
| 3.11.4 Generelle Methoden der Fluoreszenz-Mikroskopie mit Hefe | 37 |
| 3.11.5 Sporulation und Tetradenanalyse | 39 |
| 3.11.6 Konstruktion der Stämme HKY351 und HKY352 | 40 |
| 3.11.7 Aufschluss von Hefezellen in SDS-Probenpuffer | 40 |
| 3.11.8 Isolierung mRNA-bindender Proteine mittels UV-Quervernetzung <i>in vivo</i> | 41 |
| 3.11.9 Separierung von Polysomen mittels Saccharose- Dichtegradientenzentrifugation | 43 |
| 3.12 Proteinbiochemische Methoden | 44 |
| 3.12.1 Fällung von Proteinen | 44 |
| 3.12.2 Photometrische Quantifizierung von Proteinen | 44 |
| 3.12.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 45 |
| 3.12.4 Coomassie-Färbung | 46 |
| 3.12.5 Western-Transfer | 46 |
| 3.13 Spezifischer Proteinnachweis | 46 |
| 3.13.1 GFP-Mikroskopie | 46 |
| 3.13.2 Indirekte Immunfluoreszenz | 47 |
| 3.13.3 Immunoblot | 47 |
| 3.14 Nachweis von mRNA | 48 |
| 3.14.1 Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH) | 48 |
| 3.14.2 Northern-Analyse | 49 |
| 3.14.3 Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR) | 50 |

| | |
|---|------------|
| 4. Ergebnisse | 51 |
| 4.1 Gbp2p und Hrb1p besitzen Merkmale von RNA-Bindeproteinen | 51 |
| 4.2 Mtr10p und Sky1p beeinflussen die intrazelluläre Lokalisierung von Gbp2p und Hrb1p | 52 |
| 4.3 Gbp2p, Hrb1p und Npl3p pendeln in Abhängigkeit vom mRNA-Export zwischen Zellkern und Zytoplasma | 56 |
| 4.4 Eine Überexpression von Gbp2p führt zu mRNA-Exportdefekten und kann <i>npl3</i> -Mutationen nicht supprimieren | 59 |
| 4.5 Gbp2p und Hrb1p sind mit mRNA assoziiert | 62 |
| 4.6 Die pendelnden mRNA-Bindeproteine unterscheiden sich deutlich im Ausmaß der Assoziation mit aktiven Translationskomplexen | 64 |
| 4.7 Die mRNA-Dissoziation von Npl3p geschieht durch Mtr10p, nicht aber durch Sky1p | 67 |
| 4.8 Eine rechtzeitige Npl3p-Dissoziation von der mRNA ist die Voraussetzung für eine effektive Translation | 70 |
| 5. Diskussion | 76 |
| 5.1 Gbp2p und Hrb1p sind als pendelnde mRNA-Bindeproteine am nukleären mRNA-Export beteiligt | 76 |
| 5.2 Erfüllen verschiedenste pendelnde mRNA-Bindeproteine Funktionen bei der Translation? | 80 |
| 5.3 Faktoren für die nukleäre Lokalisierung von Gbp2p, Hrb1p und Npl3p | 82 |
| 5.4 Modelle der Funktionszyklen von Gbp2p und Hrb1p | 88 |
| 5.5 Ausblick | 90 |
| 6. Literaturverzeichnis | 93 |
| 7. Anhang | 105 |
| 7.1 Abkürzungen | 105 |
| 7.2 Lebenslauf | 108 |
| 7.3 Akademische Lehrer | 110 |
| 7.4 Danksagung | 111 |
| 7.5 Ehrenwörtliche Erklärung | 112 |

1. ZUSAMMENFASSUNG

Der nukleäre mRNA-Export ist ein komplexer Vorgang, an dem zahlreiche Proteinfaktoren beteiligt sind. Pendelnde mRNA-Bindeproteine, welche in Assoziation mit den mRNA-Molekülen den Zellkern verlassen und daraufhin re-importiert werden, sind hierbei von zentraler Bedeutung. Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zur Aufklärung des mRNA-Exportprozesses, indem zwei Proteine aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Gbp2p und Hrb1p, als neue Komponenten Export-kompetenter mRNA-Proteinkomplexe identifiziert werden konnten. Gbp2p und Hrb1p sind homolog und weisen jeweils drei RNA-Erkennungsmotive und eine Serin/Arginin (SR) -reiche Domäne auf. Sie sind *in vivo* mit mRNA assoziiert und verlassen den Zellkern in Abhängigkeit von der RNA-Polymerase II-Transkription und von mRNA-Exportfaktoren. Die Exportbedingungen beider Proteine sind nicht vollkommen identisch, was auf die Existenz mehrerer paralleler mRNA-Exportwege hindeutet. Die vorrangig nukleäre Lokalisierung von Gbp2p und Hrb1p hängt von dem Importrezeptor Mtr10p und der SR-spezifischen Proteinkinase Sky1p ab. Auch Mutationen von zwei speziellen SR-Dipeptiden von Gbp2p führen zu einer zytoplasmatischen Misslokalisierung des Proteins. Interessanterweise verstärkt eine Deletion von *MTR10*, nicht aber von *SKY1*, die Poly(A)⁺-RNA-Assoziation von Gbp2p in signifikantem Maße. *GBP2* und *HRB1* sind unter Standardbedingungen nicht essentiell, eine Überexpression von *GBP2* ist allerdings toxisch und führt zu einer nukleären Akkumulation von Poly(A)⁺-RNA. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse auf eine Beteiligung von Gbp2p und Hrb1p am nukleären mRNA-Export hin. Aufgrund ihrer Nicht-Essentialität haben beide Proteine das bemerkenswerte Potential, den mRNA-Export vorwiegend unter spezifischen Bedingungen zu regulieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine umfassende Analyse der zytoplasmatischen Umstrukturierungen exportierter mRNA-Proteinkomplexe vor und während der Translation vorgenommen. Hierbei zeigten sich auffällige Unterschiede im Dissoziationsverhalten der pendelnden mRNA-Bindeproteine. Während nur wenige Moleküle von Hrp1p, Nab2p und Mex67p mit aktiven Translationskomplexen kosedimentieren, sind signifikante Mengen der SR-reichen Proteine Gbp2p, Hrb1p und Npl3p und der RNA-Helikase Dbp5p mit Ribosomen-besetzten mRNA-Molekülen assoziiert. Interessanterweise verursacht eine längere Polysomen-Assoziation des Exportfaktors Npl3p einen Translationsdefekt, was eine zusätzliche Funktion des Proteins als negativer Translationsregulator nahelegt. Mit Hilfe von Polysomen-Kosedimentations-Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass Mtr10p, jedoch entgegen bisheriger Annahmen nicht Sky1p, an der zytoplasmatischen mRNA-Dissoziation von Npl3p beteiligt ist.

2. EINLEITUNG

2.1 Nukleo-zytoplasmatischer Kontakt durch Kernporenkomplexe

Eukaryontische Zellen sind durch den Einschluss des Genoms in einem spezialisierten Organell, dem Zellkern, charakterisiert. Die hierdurch erreichte räumliche und zeitliche Trennung von Nukleinsäure- und Proteinsynthese ist für eine Zelle in mehrfacher Hinsicht von Vorteil. So ermöglicht sie nicht nur eine erhöhte genetische Stabilität und Komplexität, sondern auch eine verbesserte Regulation zellulärer Prozesse. Dies sind wichtige Voraussetzungen für die Entwicklung hochkomplexer, vielzelliger Organismen (Görlich und Kutay, 1999). Die Kompartimentierung der Zelle macht allerdings zahlreiche Transportvorgänge durch die Kernhülle erforderlich.

Bei der Kernhülle handelt es sich um eine Doppelmembran, die in direktem Kontakt zum endoplasmatischen Retikulum steht. Sie ist von hochmolekularen Proteinstrukturen, den Kernporenkomplexen („*nuclear pore complexes*“, NPCs) durchsetzt, die als wässrige Kanäle den Kontakt zwischen Kern und Zytoplasma herstellen. Die Anzahl der NPCs pro Kern hängt stark von der Größe und Aktivität der jeweiligen Zelle ab und liegt bei ca. 200 in proliferierenden Hefe- (Rout und Blobel, 1993) und ca. 4.000 in Mammaliazellen (Maul, 1977). NPCs besitzen eine oktagonale, rotationssymmetrische, evolutiv hochkonservierte Struktur (Abb. 1). Das in die Kernhülle eingebettete, zylindrische Zentralelement besteht aus mehreren Ringen, die den Transportkanal umschließen und über Speichen miteinander verbunden sind. Dem Zentralelement entspringen auf beiden Seiten jeweils acht periphere Filamente, wobei auf der nukleären Seite eine korbähnliche Struktur entsteht, da die Filamente an ihrem distalen Ende durch einen weiteren Ring miteinander verbunden sind (Vasu und Forbes, 2001; Fahrenkrog und Aebi, 2003; Kiseleva *et al.*, 2004). Sowohl in Hefe als auch in Vertebraten sind rund 30 verschiedene Proteine, die sogenannten Nukleoporine, am Aufbau der Kernporenkomplexe beteiligt (Rout *et al.*, 2000; Cronshaw *et al.*, 2002). Aufgrund der Symmetrie liegen alle Nukleoporine in einer mindestens achtfachen Kopienzahl pro NPC vor, dies erklärt die enorme Massivität der Komplexe. NPCs besitzen ein Molekulargewicht von 45 bis 60 MDa in Hefe (Rout *et al.*, 2000) und 90 bis 120 MDa in Vertebraten (Reichelt *et al.*, 1990; Cronshaw *et al.* 2002) und gehören damit zu den größten molekularen Zellstrukturen.

Der Transportkanal weist im Ruhezustand einen Durchmesser von 9 nm auf und erlaubt die passive Diffusion von Ionen (Feldherr und Akin, 1997; Keminer und Peters, 1999). Zudem findet ein aktiver, selektiver und direktonaler Transport von Proteinen und Ribonukleoprotein-Komplexen (RNPs) statt. Der Kanal kann sich hierfür auf bis zu 45 nm weiten (Stoffler *et al.*, 2003), die Ausschlussgröße der Makromoleküle liegt bei

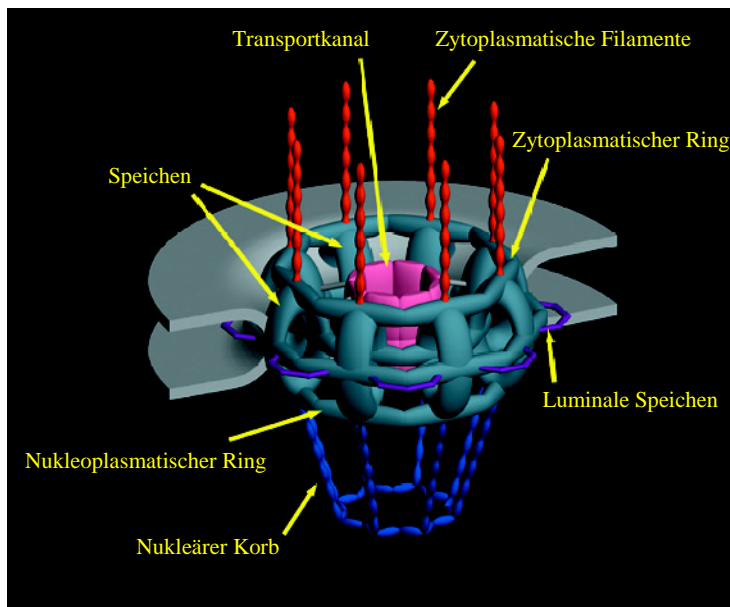


Abb. 1. Dreidimensionales Modell eines Kernporenkomplexes aus Vertebratenzellen. Das oktagonale Zentralelement durchspannt die im Querschnitt dargestellte Kernhülle und besteht aus über Speichen miteinander verbundenen Ringen, die den Transportkanal umschließen. An beiden Seiten entspringen periphere Anhänge, die zytoplasmatischen Filamente und der nukleäre Korb (aus Wozniak und Lusk, 2003).

einem Durchmesser von etwa 40 nm (50 MDa) (Panté und Kann, 2002). Wie Ribbeck und Görlich (2001) in einer kinetischen Studie mit wachsenden Mammaliazellen zeigten, ist die maximale Translokationsrate eines einzelnen NPCs mit 80 MDa pro Sekunde immens hoch. Dies ist auf die Beteiligung mobiler Rezeptoren am aktiven Transport zurückzuführen. Die Rezeptoren weisen nicht nur eine Affinität zum jeweiligen Transportsubstrat, sondern auch zu Phenylalanin-Glycin-reichen (FG-) Sequenzen bestimmter Nukleoporine auf und ermöglichen hierdurch eine rasche Passage des NPCs. Bezüglich des genauen Mechanismus der Translokation werden gegenwärtig drei verschiedene Modelle diskutiert (Rout *et al.*, 2000; Ribbeck und Görlich, 2002; Fahrenkrog und Aebi, 2003).

Die Mehrzahl aller Kerntransportprozesse wird durch Rezeptormoleküle der sogenannten Karyopherin-Familie vermittelt. Beim Export zellulärer mRNAs kommt diesen Rezeptoren jedoch nur eine sehr untergeordnete Rolle zu (Neville und Rosbash, 1999; Cullen 2003).

2.2 Karyopherin-vermittelter Kerntransport

Die Kerntransport-Rezeptoren der Karyopherin-Familie (Kap), von denen man 14 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und über 20 in höheren Eukaryonten findet, werden je nach Spezialisierung auf eine Transferrichtung auch als Importine und Exportine bezeichnet. Charakteristisch ist der Besitz von 15 bis 20 HEAT-Domänen, die aus zwei über eine Schleife verbundenen α -Helices bestehen und den Proteinen eine hohe Flexibilität verleihen. Des weiteren ist allen Karyopherinen eine unkonservierte carboxyterminale Domäne gemein, mit deren Hilfe sie ihr Substrat hochspezifisch anhand eines Transportsignals identifizieren und binden. Die Transportsignale sind hierbei von ganz

unterschiedlicher Gestalt und folgen häufig keiner definierten Konsensussequenz. Einige Signale, beispielsweise diejenigen ribosomaler Proteine, erlauben nicht nur die Assoziation mit einem bestimmten, sondern mit verschiedenen Karyopherinen, wodurch ein gewisses Maß an Redundanz entsteht (Strom und Weis, 2001; Fried und Kutay, 2003).

Oft ist der Kontakt zwischen Rezeptor und Substrat nicht direkt, sondern kommt über ein Adaptermolekül zustande. Die Verwendung verschiedener Adapter verhilft beispielsweise dem gut charakterisierten Mammalia-Protein Importin β (Kap95p in *S. cerevisiae*) zu großer Vielseitigkeit (Chi *et al.*, 1995; Enenkel *et al.*, 1995). So erkennt es mit Hilfe von Importin α solche Proteine, die ein klassisches, basisches Kernlokalisationssignal („nuclear localization signal“, NLS) aufweisen (Görlich *et al.*, 1995; Moroianu *et al.*, 1995). Über den Adapter Snurportin hingegen ist es in der Lage, Uracil-reiche kleine nukleäre RNAs („uracil-rich small nuclear RNAs“, U snRNAs) im Anschluss an deren zytoplasmatische Prozessierung zu reimportieren (Huber *et al.*, 1998). Ferner bindet Importin β Substrate mit ausgedehnten basischen Domänen direkt. Hierzu zählen verschiedene virale Proteine, Histone sowie ribosomale Proteine, die für den nukleolären Zusammenbau der prä-ribosomalen Untereinheiten importiert werden müssen (Jäkel und Görlich, 1998; Palmeri und Malim, 1999; Truant und Cullen, 1999).

Das Karyopherin Transportin hingegen ist - ebenso wie das homologe Protein Kap104p aus *S. cerevisiae* - hauptsächlich für den nukleären Import verschiedener mRNA-Bindeproteine verantwortlich. Sein bekanntestes Substrat ist hnRNP A1 („heterogeneous nuclear RNP“), welches es an einer Glycin-reichen, mit M9 bezeichneten Peptidsequenz erkennt (Siomi *et al.*, 1997; Bogerd *et al.*, 1999). Kap104p importiert die Proteine Hrp1p („hnRNP-like protein“) und Nab2p („nuclear abundant poly(A) RNA binding protein“) (Lee und Aitchison, 1999) (vgl. 2.3).

Als drittes Beispiel für importierende Karyopherine sind Transportin-SR und das *S. cerevisiae*-Homolog Mtr10p („mRNA transport defective“)/Kap111p anzuführen. Transportin-SR bindet an Arginin/Serin (RS)-reiche Domänen von SR-Proteinen, essentiellen Regulatoren des Prä-mRNA-Spleißens in Metazoenzellen (Graveley, 2000; Lai *et al.*, 2001), Mtr10p erkennt die RS-ähnliche Domäne des mRNA-Exportfaktors Npl3p („nuclear protein localization“) (Senger *et al.*, 1998) (vgl. 2.4).

Bei dem best-charakterisierten Kernexportsignal („nuclear export signal“, NES) handelt es sich um eine kurze, Leucin-reiche Peptidsequenz. Diese markiert Proteine diverser Klassen, hierunter Zellzyklusregulatoren und Transkriptionsfaktoren, für den Transport durch das Karyopherin CRM1/XPO1 („exportin“) (Crm1p/Xpo1p/Kap124p in *S. cerevisiae*). CRM1 besitzt ein außerordentlich breites Substratspektrum und ist - teilweise unter Zuhilfenahme verschiedener Adapter - überdies in den Export von U snRNAs, prä-ribosomalen Untereinheiten, Snurportin und einer Vorstufe des Signalerkennungspartikels („signal recognition

particle“, SRP) involviert (Fornerod *et al.*, 1997; Paraskeva *et al.*, 1999; Ohno *et al.*, 2000; Grosshans *et al.*, 2001; Thomas und Kutay, 2003).

Der Export von tRNAs hängt von den Transportrezeptoren Exportin-t (Los1p in *S. cerevisiae*) und Exportin-5 ab, welche sich durch eine direkte Bindung der RNA-Substrate von anderen Karyopherinen absetzen (Arts *et al.*, 1998; Hellmuth *et al.*, 1998; Calado *et al.*, 2002). Wie erst kürzlich von mehreren Gruppen gezeigt wurde, ist Exportin-5 zudem für den Export sogenannter Prä-microRNAs (Prä-miRNAs) verantwortlich. Prä-miRNAs werden im Zytoplasma prozessiert und übernehmen im reifen Zustand als ca. 22 Nukleotide lange, endogene, nicht-kodierende RNA-Moleküle eine bedeutende Rolle bei der post-transkriptionellen Genregulation (Bohnsack *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004).

Karyopherine können ihre Substrate gegen ein starkes Konzentrationsgefälle transportieren. Dies erfordert den Verbrauch metabolischer Energie, doch der eigentliche Translokationsvorgang hat sich als vollkommen Energie-unabhängig und reversibel erwiesen (Englmeier *et al.*, 1999; Nachury und Weis, 1999). Energie, die aus der Hydrolyse von GTP durch die kleine GTPase Ran („ras-related nuclear protein“) stammt, wird vielmehr für den Aufbau und die Aufrechterhaltung eines steilen RanGTP-Gradienten über der Kernhülle aufgewendet. Dieser Gradient wird von allen Karyopherinen über eine schwach konservierte, aminoterminal RanGTP-Bindedomäne detektiert, beeinflusst ihre Substrataffinität und ist hierdurch für die Direktionalität der Transportprozesse verantwortlich (Abb. 2). So fördert die niedrige Konzentration von RanGTP im Zytoplasma die Bildung von Importrezeptor-Substrat-Komplexen, welche anschließend im RanGTP-reichen Milieu des Zellkerns rasch zerfallen. Bei Exportrezeptoren ist eine Interaktion mit RanGTP hingegen essentiell für die Substratbindung, und die Dissoziation der aus Exportrezeptor, Substrat und RanGTP bestehenden Komplexe wird im Zytoplasma durch die Hydrolyse von RanGTP initiiert (Nakielnny und Dreyfuss, 1999; Macara, 2001; Fried und Kutay, 2003). Der Rücktransport der unbeladenen Karyopherine erfolgt selbsttätig und im Fall der Importrezeptoren im RanGTP-gebundenen Zustand. Um einer resultierenden zytoplasmatischen Akkumulation von Ran entgegenzuwirken, wird dieses von dem stark spezialisierten Transportrezeptor NTF2 („nuclear transport factor“) reimportiert, der keine Homologie zu Karyopherinen aufweist (Smith *et al.*, 1998).

Der Ran-Gradient basiert auf einer asymmetrischen Verteilung spezifischer Regulatoren (Abb. 2). So stimuliert das im Zytoplasma lokalisierte Protein RanGAP („Ran-specific GTPase activating protein“) mit Unterstützung der Ran-Bindeproteine RanBP1 und RanBP2 („Ran binding protein“) die GTPase-Aktivität von Ran. Der Chromatin-assoziierte und folglich nukleäre Faktor RanGEF („Ran-specific guanine nucleotide exchange factor“) hingegen fördert den Austausch von Ran-gebundenem GDP gegen GTP und bestimmt auf

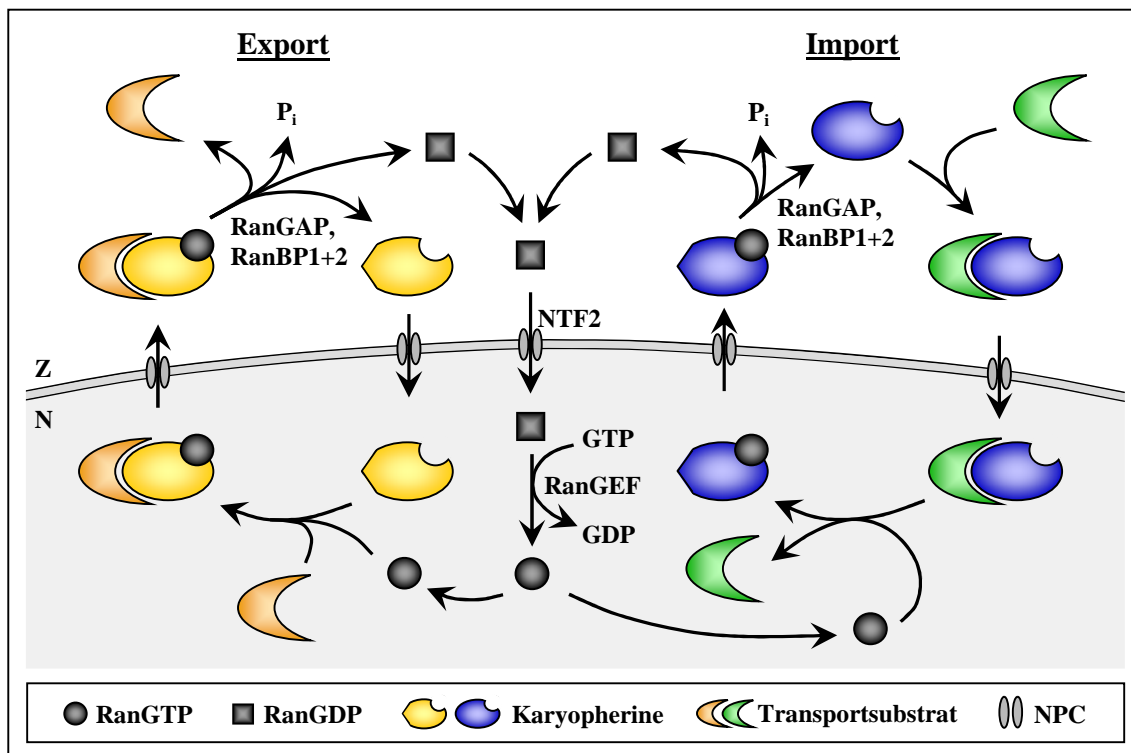


Abb. 2. Schematische Darstellung Karyopherin-vermittelter Kerntransportprozesse und ihrer Regulierung durch das RanGTPase-System. Die asymmetrische Verteilung spezifischer Regulatoren der kleinen GTPase Ran (RanGAP, RanBP1, RanBP2, RanGEF) führt zur Entstehung eines RanGTP-Gradienten über der Kernhülle, auf dem die Direktionalität der Transporte basiert. Exportrezeptoren binden ihre Substrate lediglich im RanGTP-reichen Nukleoplasma und setzen sie nach GTP-Hydrolyse im Zytoplasma frei, für Importrezeptoren gilt Gegenteiliges. Um den stetigen Austritt von RanGTP auszugleichen, wird das gebildete RanGDP über den Rezeptor NTF2 importiert (nach Görlich und Kutay, 1999). N: Nukleoplasma; P_i: anorganisches Phosphat; Z: Zytoplasma

diese Weise die hohe RanGTP- und niedrige RanGDP-Konzentration in seinem Kompartiment (Klebe *et al.*, 1995; Bischoff *et al.*, 1995; Bischoff *et al.*, 2002).

Über den Kerntransport hinaus ist Ran auch an anderen zellulären Prozessen beteiligt. In den letzten Jahren wurden zunehmend Funktionen beim Aufbau der Mitosespindel, der Kernhülle und der Kernporenkomplexe beschrieben (Bamba *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 2003).

2.3 Nukleärer Export von mRNA

Obwohl maßgeblich für den Kerntransport aller nicht-kodierenden Ribonukleinsäuren verantwortlich, sind Karyopherine - und mit ihnen das RanGTPase-System - nur selten auch in den Export von mRNA involviert (Neville und Rosbash, 1999; Clouse *et al.*, 2001). Beispiele einer direkten Beteiligung finden sich bei Retroviren, die CRM1 mit Hilfe NES-haltiger Adapter für den Export ungespleißter mRNA-Moleküle rekrutieren und auf diese Weise zelluläre Prozessierungskontrollen umgehen (Wolff *et al.*, 1997; Popa *et al.*, 2002). Zudem mehren sich die Hinweise auf einen CRM1-abhängigen Export einiger zellulärer

mRNAs, hierunter humane Transkripte mit Adenosin-Uridin-reichen Elementen in der untranslatierten 3'-Region (Gallouzi und Steitz, 2001; Yang *et al.*, 2001).

mRNA-Moleküle verlassen den Zellkern in Assoziation mit vielen verschiedenen Proteinen, doch nicht allein der Umfang und die Komplexität der Transportsubstrate stellen hohe Anforderungen an die Exportmaschinerie. Diese muss vielmehr zusätzlich in der Lage sein, zwischen unreifen und voll prozessierten Transkripten zu unterscheiden und schnell auf verschiedene Signale zu reagieren. Aus diesen Gründen wird der überwiegende Teil der mRNA-Moleküle über eine sehr spezielle Maschinerie exportiert, welche eng mit Transkription und Prozessierung verknüpft ist und hierdurch ein hohes Maß an Kontrolle und Regulation erlaubt (Reed und Hurt, 2002; Stutz und Izaurralde, 2003). Auch bei mRNA-Exportkomplexen findet sich allerdings das generelle Prinzip des Aufbaus aus Substrat, Adaptermolekül und Transportrezeptor wieder.

Bereits mit Hilfe des Transkriptionsapparats werden Exportfaktoren zu den entstehenden Prä-mRNA-Molekülen dirigiert (Abb. 3). Studien an *S. cerevisiae* zeigten, dass dem an der Transkriptionselongation beteiligten, heterotetrameren THO-Komplex („Tho2p-Hpr1p-Mft1p-Thp2p“) hierbei eine bedeutende Funktion zukommt (Rondón *et al.*, 2003). Dieser wandert mit der RNA-Polymerase II über das Gen und rekrutiert dabei die RNA-Helikase Sub2p („suppressor of brr1-1“) (UAP56 in Vertebraten). Sub2p wurde ursprünglich als Spleißfaktor identifiziert (Zhang und Green, 2001), wird über den THO-Komplex allerdings auch auf intronlose RNA-Moleküle geladen und rekrutiert seinerseits den Exportadapter Yra1p („yeast RNA annealing protein“) (Aly/REF in Vertebraten), welcher die RNA daraufhin direkt bindet (Jensen *et al.*, 2001; Sträßer und Hurt, 2000 und 2001). Auf diese Weise kommt der sogenannte TREX-Komplex („transcription/export“) zustande, dessen Existenz auch in humanen Zellen nachgewiesen wurde (Sträßer *et al.*, 2002; Zenklusen *et al.*, 2002).

Sub2p interagiert mit einem weiteren Exportfaktor, Sac3p, der die primären Transkripte ersten Hinweisen zufolge ebenfalls in einem sehr frühen Stadium bindet, vermittelt über den an der Transkriptionsinitiation beteiligten SAGA-Histonacetylase-Komplex und Sus1p (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004). Ob die Funktion von Sac3p und dem assoziierten Protein Thp1p darin besteht, spezifische Gene oder deren Transkripte in die räumliche Nähe der NPCs zu bringen oder die mRNPs bei der eigentlichen Translokation zu unterstützen, wird momentan kontrovers diskutiert (Fischer *et al.*, 2002; Lei *et al.*, 2003).

Auch die essentiellen mRNA-Exportfaktoren Dbp5p („DEAD box protein“)/Rat8p und Npl3p aus *S. cerevisiae* werden durch den Transkriptionsapparat auf die Prä-mRNA transferiert. Die RNA-Helikase Dbp5p bindet an Komponenten des Transkriptionsfaktors IIH und scheint aktiv an der Transkription beteiligt zu sein (Estruch und Cole, 2003), für Npl3p postulierten Lei *et al.* (2001) eine direkte Interaktion mit der RNA-

Polymerase II. Über die hyperphosphorylierte, carboxyterminale Domäne ihrer größten Untereinheit ist die Polymerase zudem in diverse Schritte der Prä-mRNA-Prozessierung involviert, die teilweise ebenfalls ko-transkriptionell erfolgt und den mRNA-Export stark beeinflusst (Proudfoot *et al.*, 2002).

Die Prä-mRNA-Prozessierung umfasst mehrere kovalente Modifikationen, hierunter die Bildung einer Kappen-Struktur am 5'-Ende, das Spleißen sowie das Trimmen und Polyadenylieren des 3'-Endes. Die Bildung der 5'-Kappe beginnt bereits nach Erreichen einer Länge von 20 bis 30 Nukleotiden und resultiert zunächst in der Entstehung einer 7-Methylguanosin-Struktur. Diese wird im Anschluss von dem CBC-Komplex („cap binding complex“) erkannt, welcher sich aus den Proteinen CBP80 und CBP20 („cap binding protein“) zusammensetzt (Shuman, 2001). Die Kappe stabilisiert die mRNA (Beelman und Parker, 1995) und unterstützt zudem die weiteren Prozessierungsschritte (Lewis und Izaurralde, 1997).

Das nukleäre Prä-mRNA-Spleißen führt in zweiphasigen Transesterifizierungs-Reaktionen zur Entfernung intronischer Sequenzen bei gleichzeitiger Fusion der kodierenden Exons. Der Vorgang wird durch das Spleißosom, einem aus U snRNPs, SR- und diversen anderen Proteinen bestehenden Ribonukleoprotein-Partikel, katalysiert (Burge *et al.*, 1999). Das Spleißosom initiiert außerdem die Bildung von 20-24 Nukleotide stromaufwärts der Fusionsstellen gelegenen, multimeren Proteinkomplexen („exon junction complexes“, EJC), die den Export betreffender mRNAs fördern. Dieser positive Effekt wurde erklärbar, nachdem für mehrere Komponenten und assoziierte Faktoren der EJCs eine direkte Export-rezeptor-Bindung nachgewiesen werden konnte. Hierbei handelt es sich neben Y14, magoh und dem SR-Protein SRp20 um Aly, auch in diesem Fall rekrutiert von der spleißosomalen Helikase UAP56 (Kataoka *et al.*, 2001; Le Hir *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2003). In Hefezellen ist die Existenz von EJCs bislang nicht gezeigt, doch auch hier gibt es Hinweise auf eine Beteiligung des Spleißens am mRNA-Export (Lei und Silver, 2002).

Bis auf wenige Ausnahmen weisen alle reifen mRNA-Moleküle ein einheitliches 3'-Ende auf, welches in Hefe aus 70-90 und in Mammaliazellen aus 200-300 Adenosinresten besteht. An der Bildung des Poly(A)-Schwanzes sind verschiedene multimeren Proteinkomplexe beteiligt. Diese spalten die Prä-mRNA stromabwärts eines UA-reichen Polyadenylierungssignals und unterstützen anschließend das Anfügen der neuen Nukleotide durch die Poly(A)-Polymerase. Noch während der Synthese erkennt ein Poly(A)-Bindepotein (Pab1p in *S. cerevisiae*, PABPII in Mammalia) den Poly(A)-Schwanz und kontrolliert dessen Länge (Wahle und Rügsegger, 1999; Zhao *et al.*, 1999). Die 3'-Prozessierung erhöht die Effizienz des mRNA-Exports deutlich, was auch hier auf eine Rekrutierung von Exportfaktoren hinweist (Brodsky und Silver, 2000). In *S. cerevisiae* konnten Lei und Silver (2002) in der Tat eine positive Korrelation zwischen der

3'-Prozessierung und der mRNA-Assoziation von Yra1p beobachten. Auch weitere Proteine mit potentiellen Funktionen im mRNA-Export werden auf diesem Weg dauerhaft an das Transkript gebunden. Hierzu zählen sowohl eine spezifisch das Polyadenylierungssignal UAUUAU erkennende und mit Hrp1p bezeichnete Komponente des Spaltungskomplexes I („cleavage factor I“, CF I) (Kessler *et al.*, 1997; Minvielle-Sebastia *et al.*, 1998), als auch Nab2p, welches ebenso wie Pab1p die Länge des Poly(A)-Schwanzes reguliert (Green *et al.*, 2002; Hector *et al.*, 2002) (Abb. 3).

Exportfaktoren werden somit über verschiedene Mechanismen auf die Prä-mRNAs transferiert. Die Bedeutung der einzelnen Mechanismen variiert zwischen den Organismen und mRNAs, denn während das Spleißen den Exportprozess deutlich fördert, weisen 5 % der humanen und 95 % der *S. cerevisiae*-Gene keine intronischen Sequenzen auf (Goffeau *et al.*, 1996; Venter *et al.*, 2001). In diesen Fällen könnte der Rekrutierung mittels Transkription und 3'-Prozessierung ein höherer Stellenwert zukommen (Abruzzi *et al.*, 2004), doch auch die spontane Bindung von Exportfaktoren an sogenannte mRNA-Identitätselemente wird diskutiert (Ohno *et al.*, 2002). Beispielsweise interagieren die als Exportadapter identifizierten SR-Proteine SRp20 und 9G8 mit einer spezifischen Sequenz des intronlosen Histon *H2a*-Transkripts (Huang und Steitz, 2001; Huang *et al.*, 2003). Die Existenz von Identitätselementen erklärt möglicherweise auch, weshalb sich weder Transkription noch Prozessierung als absolut essentiell für den mRNA-Export erwiesen haben (Rodrigues *et al.*, 2001; Ullman, 2002; Fried und Kutay, 2003).

Da Adaptermoleküle die Transkripte bereits in einem frühen Stadium binden, muss der Export bis zum Abschluss aller Reifungsprozesse aktiv unterbunden werden. Dies geschieht durch spezielle Kontrollmechanismen und die inhibierende Wirkung diverser Prozessierungsfaktoren. Aus diesem Grund können auch fehlerhafte mRNAs den Zellkern meist nicht verlassen, sondern akkumulieren am Ort der Transkription und werden dort von einem Komplex aus Exoribonukleasen, dem nukleären Exosom, degradiert (Jensen *et al.*, 2003; Galy *et al.*, 2004).

Exportkompetente mRNPs hingegen werden zum NPC geleitet. So interagieren in *S. cerevisiae* sowohl Nab2p als auch Npl3p mit dem nukleoplasmatischen, NPC-assoziierten Protein Mlp1p (Tpr in Mammalia) (Green *et al.*, 2003). Des weiteren vermittelt der Sac3p-Thp1p-Komplex einen direkten Kontakt zwischen dem mit Hilfe der Adaptermoleküle Yra1p und Npl3p (vgl. 2.4) rekrutierten mRNA-Transportrezeptor und Nukleoporinen des nukleären Korbs (Fischer *et al.*, 2002; Gilbert und Guthrie, 2004). Nach Studien an *Xenopus*-Oozyten postulierten Blevins *et al.* (2003) eine derartige Funktion auch für das NPC-assoziierte Protein Gle2 (Rae1p/Gle2p in *S. cerevisiae*) (Abb. 3).

Kerntransport-Rezeptoren sind durch eine direkte Bindung der FG-Domänen spezifischer Nukleoporine und eine direkte oder Adapter-vermittelte Bindung ihrer Transportsubstrate

charakterisiert. Alle bislang identifizierten generellen mRNA-Transportrezeptoren gehören der evolutiv konservierten NXF („nuclear export factor“) -Familie an und wirken in Assoziation mit einem kleinen Kofaktor. Beispielsweise findet sich in *S. cerevisiae* ein heterodimerer Komplex aus dem NXF-homologen Protein Mex67p („mRNA export“) und Mtr2p („mRNA transport regulator“) (TAP-p15 in Vertebraten) (Katahira *et al.*, 1999; Sträßer *et al.*, 2000; Wiegand *et al.*, 2002). Mehrere Hinweise lassen die Existenz weiterer Rezeptormoleküle sowie verschiedener paralleler mRNA-Exportwege vermuten. So konnte Mex67p in einer Genom-weiten Analyse auf lediglich 19 % aller mRNAs nachgewiesen werden und scheint vorwiegend bestimmte funktionelle Transkriptklassen zu erkennen. Yra1p war auf 17 % aller mRNAs und auf 31 % der Mex67p-gebundenen mRNAs zu detektieren (Hieronymus und Silver, 2003). Zudem wurden unterschiedliche Export-Bedingungen für Nab2p- und Npl3p-gebundene (Duncan *et al.*, 2000) sowie für generelle und stressinduzierte mRNAs gezeigt (Saavedra *et al.*, 1997; Krebber *et al.*, 1999; Farago *et al.*, 2003).

Es wird diskutiert, dass die mRNPs den Zellkern vorwiegend durch Chromatin-assoziierte NPCs verlassen (Iborra *et al.*, 2000; Galy *et al.*, 2004). Im Verlauf der Translokation, die in partiell entfaltetem Zustand und mit dem 5'-Ende in Führung stattfindet, kommt es zu massiven Umstrukturierungen (Daneholt, 1997). Viele Proteine dissoziieren und verbleiben im Kern, andere begleiten die mRNA in das Zytoplasma, werden erst zu einem späteren Zeitpunkt abgelöst und daraufhin reimportiert. In *S. cerevisiae* sind gegenwärtig neun zwischen den Kompartimenten pendelnde mRNA-Bindeproteine bekannt. Hierbei handelt es sich um den Exportrezeptor Mex67p-Mtr2p (Santos-Rosa *et al.*, 1998), die Kappenproteine Cbp80p und Cbp20p (Shen *et al.*, 2000), das Poly(A)-Bindeprotein Pab1p (Minvielle-Sebastia *et al.*, 1997), Hrp1p (Kessler *et al.*, 1997), Nab2p (Lee und Aitchison, 1999), Npl3p (Lee *et al.*, 1996) und Dbp5p (Hodge *et al.*, 1999). Dbp5p wird aufgrund seiner ATPase- und RNA-Helikase-Aktivität als treibende Kraft hinter der Translokation und den Umstrukturierungen des mRNPs vermutet. An den zytoplasmatischen Filamenten kontaktiert das Enzym einen aus den Nukleoporinen Rip1p/Nup42p, Rat7p/Nup159p sowie Gle1p und Gfd1p bestehenden Proteinkomplex und ist an der Ablösung des mRNPs vom NPC beteiligt (Snay-Hodge *et al.*, 1998; Hodge *et al.*, 1999; Strahm *et al.*, 1999). Auch für Nab2p wurde eine Interaktion mit Gfd1p nachgewiesen (Suntharalingam *et al.*, 2004) (Abb. 3).

Meist beginnt die Translation bereits während des Exportprozesses (Daneholt, 1997), einige Transkripte benötigen jedoch zuvor eine spezielle Lokalisierung im Zytoplasma. Dieser Mechanismus gewährleistet eine ortsgerichtete Proteinproduktion und ist nicht nur in polarisierten Zellen, sondern unabhängig vom Zelltyp auch bei Proteinen verschiedener Organellen und subzellulärer Strukturen zu beobachten. Die Lokalisierung der mRNAs geschieht in vielen Fällen durch aktiven, gerichteten Transport entlang der Elemente des

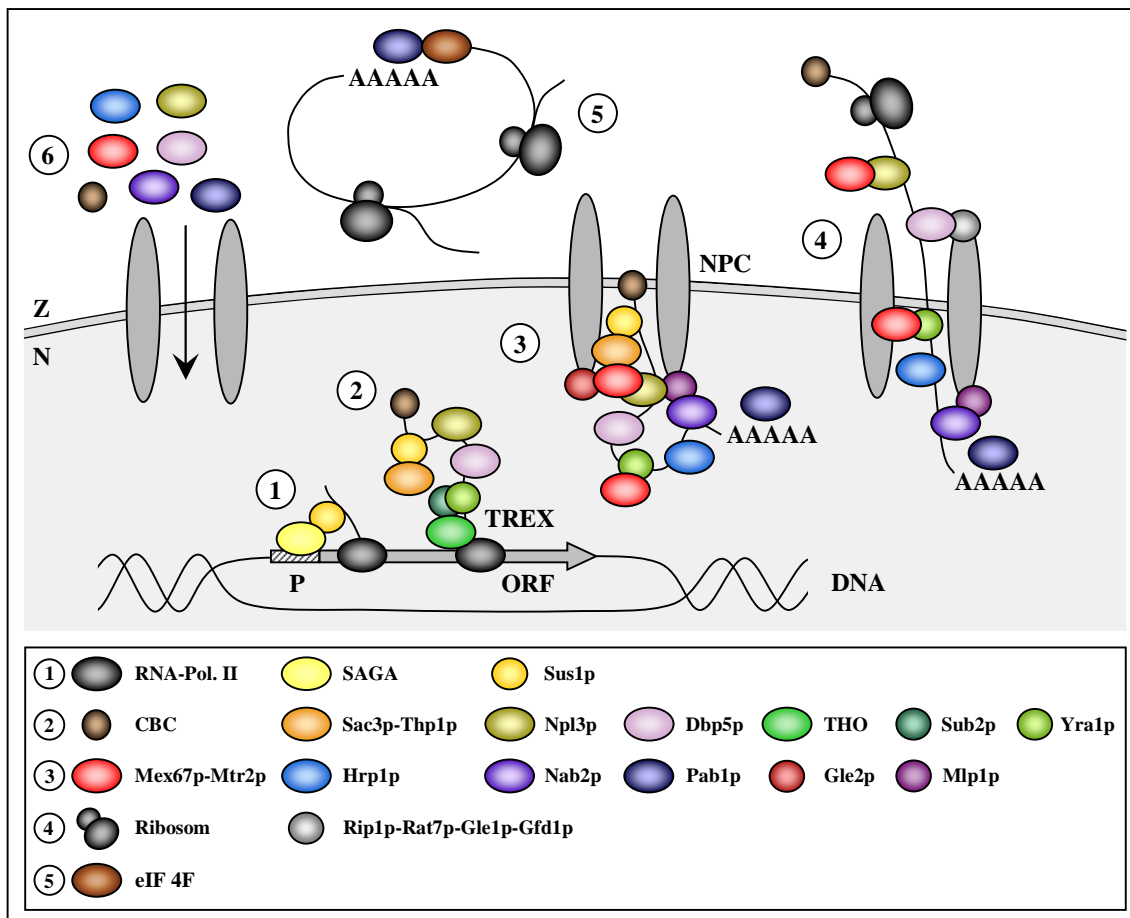


Abb. 3. Vereinfachtes Modell des nukleären mRNA-Exports in *S. cerevisiae*. Die Exportfaktoren Sac3p-Thp1p, Npl3p, Dbp5p, Yra1p, Hrp1p und Nab2p werden im Verlauf der Transkription und 3'-Prozessierung auf die Prä-mRNA geladen (1-3). Für Yra1p wird zudem eine Rekrutierung während des Spleißens diskutiert (nicht dargestellt). Nab2p und Npl3p stellen durch Interaktion mit dem Protein Mlp1p einen ersten Kontakt zum NPC her. Zusätzlich wird der von den Adaptermolekülen Yra1p und Npl3p gebundene Exportrezeptor Mex67p-Mtr2p über Sac3p-Thp1p und Gle2p zum nukleären Korb des NPCs geleitet (3). Während der Translokation kontaktiert er die FG-Domänen spezifischer Nukleoporine. Die RNA-Helikase Dbp5p entwindet die mRNA im Verlauf der NPC-Passage und interagiert an den zytoplasmatischen Filamenten mit einem Komplex aus Rip1p, Rat7p, Gle1p und Gfd1p (4). Über Gfd1p erkennt auch Nab2p diesen Komplex (nicht dargestellt). Eine konkrete Exportfunktion des Proteins Hrp1p ist nicht bekannt. Ebenso ungeklärt ist, ob die Faktoren - wie hier gezeigt - in demselben oder in parallelen mRNA-Exportwegen fungieren und in welcher Kopienzahl sie die Transkripte binden. Nach Erreichen des Zytoplasmas beginnt die Translation. Der Translationsinitiationsfaktor eIF 4F ersetzt den CBC-Komplex am 5'-Ende und führt durch Interaktion mit dem Poly(A)-Bindepotein Pab1p einen Ringschluss der mRNA herbei (5). Die pendelnden mRNA-Bindeproteine dissoziieren und werden reimportiert (6). Für Referenzen siehe Text. A: Adenosin; N: Nukleoplasma; ORF: offener Leserahmen; P: Promotor; RNA-Pol. II: RNA-Polymerase II und Transkriptionsfaktoren; Z: Zytoplasma

Zytoskeletts, in *S. cerevisiae* kommt den Proteinen She1p bis She5p hierbei eine bedeutende Funktion zu (Chartrand *et al.*, 2001; Kloc *et al.*, 2002).

Nach Erreichen des Zytoplasmas wird der CBC-Komplex vom 5'-Ende der mRNA verdrängt und durch ein Heterotrimer namens eIF 4F („eukaryotic initiation factor“) ersetzt. eIF 4F interagiert mit dem Poly(A)-Bindepotein, führt auf diese Weise einen Ringschluss der mRNA herbei und leitet die Rekrutierung der kleinen ribosomalen Untereinheit ein

(Gingras *et al.*, 1999) (Abb. 3). Neben dem 5'- und 3'-Ende sind auch die EJC-Komplexe aktiv in die Translationsinitiation eingebunden (Chan *et al.*, 2004; Nott *et al.*, 2004), eine korrekte Prozessierung der Transkripte wird dementsprechend in mehrfacher Hinsicht gefordert und überprüft. Überdies existiert ein Kontrollmechanismus zur Detektion vorzeitiger Terminationskodons, der sogenannte NMD („nonsense-mediated decay“) (Maquat, 2004). Vorzeitige Terminationskodons resultieren entweder aus einer genomischen Mutation, einer fehlerhaften Transkription oder einer Verschiebung des Leserasters infolge ungenauen Spleißens. Sie befinden sich meist nicht wie sonst üblich im letzten Exon und können daher anhand ihrer Position relativ zum letzten EJC identifiziert werden. Nach aktuellem NMD-Modell wird die mRNA noch vor Dissoziation des CBC-Komplexes ein erstes Mal translatiert. In dieser sogenannten Pionerrunde entfernen die Ribosomen die EJCs (Dostie und Dreyfuss, 2002; Lejeune *et al.*, 2002), werden bei Antreffen eines vorzeitigen Terminationssignals jedoch unterbrochen. Die EJC-Komponente Upf3 rekrutiert in dieser Situation spezielle Faktoren, welche eine Degradierung der betreffenden mRNA einleiten und somit die Produktion verkürzter und mitunter schädlicher Polypeptide verhindern (Kim *et al.*, 2001; Le Hir *et al.*, 2001). In *S. cerevisiae* ist der NMD vom Spleißvorgang entkoppelt, die Rolle der EJCs wird hier von dem Prozessierungsfaktor Hrp1p übernommen. Seiner Mehrfachfunktion entsprechend bindet Hrp1p neben dem Polyadenylierungssignal auch sogenannte DSE-Elemente („downstream sequences elements“) in der kodierenden Region der mRNAs (González *et al.*, 2000). Nach verschiedenen Hinweisen auf Translationsvorgänge im Zellkern wird zusätzlich zum beschriebenen zytoplasmatischen NMD die Existenz einer nukleären Variante diskutiert (Wilkinson und Shyu, 2002).

2.4 SR-Proteine und das SR-ähnliche Protein Npl3p

Mitglieder der hochkonservierten REF-Familie, hierunter Yra1p und Aly/REF, sind bereits seit längerem als mRNA-Exportadapter beschrieben (Stutz *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2001). Zudem ordneten Huang *et al.* (2003) mit SRp20, 9G8 und ASF/SF2 unlängst drei SR-Proteine in diese funktionelle Klasse ein. SR-Proteine waren zuvor überwiegend als essentielle Komponenten des Metazoen-Spleißosoms bekannt, welche während des konstitutiven Spleißens mannigfaltige Funktionen übernehmen und auch für die Selektion alternativer Spleißstellen von besonderer Bedeutung sind (Graveley, 2000; Sanford *et al.*, 2003). Für die Bindung der RNA weisen die SR-Proteine ein bis zwei aminoterminaler RNA-Erkennungsmotive („RNA recognition motifs“, RRM) auf. Ihr Name bezieht sich hingegen auf eine carboxyterminale Domäne mit zahlreichen aufeinanderfolgenden Wiederholungen der Dipeptide RS oder SR, mit deren Hilfe weitere Proteine der Spleiß-Maschinerie rekrutiert werden (Graveley und Maniatis, 1998). Während sich die Mehrzahl der SR-Proteine

ausschließlich im Zellkern befindet, pendeln SRp20, 9G8 und ASF/SF2 ihrer Adapterfunktion gemäß zwischen Nukleo- und Zytoplasma (Cáceres *et al.*, 1998). In allen Fällen ist es die RS-Domäne, die den Kontakt zu dem SR-spezifischen Importrezeptor Transportin-SR vermittelt (Lai *et al.*, 2001) (vgl. 2.2). Die Protein-Interaktionen der RS-Domäne werden durch extensive Phosphorylierungen der Serinreste reguliert, hierfür sind vorwiegend SR-Proteinkinasen der SRPK- und Clk/Sty-Familien verantwortlich (Colwill *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998; Yun *et al.*, 2003). Der Phosphorylierungsgrad beeinflusst darüber hinaus die intranukleäre Lokalisierung der SR-Proteine (Sacco-Bubulya und Spector, 2002).

In Hefe gestaltet sich der Spleißvorgang deutlich einfacher als in Metazoenzellen, und das Genom von *S. cerevisiae* kodiert kein SR-Protein von oben beschriebener, klassischer Struktur (Boucher *et al.*, 2001). Dennoch existiert hier mit dem SRPK-homologen Enzym Sky1p („SR kinase in yeast“) eine - wenn auch aller Voraussicht nach einzige - SR-Proteinkinase (Siebel *et al.*, 1999). Die Autoren beobachteten ferner eine SRPK-abhängige Phosphorylierung verschiedener Hefeproteine, bislang ist allerdings lediglich ein Protein eindeutig als endogenes Substrat für Sky1p identifiziert. Hierbei handelt es sich um Npl3p, welches ebenso wie Sky1p unter anderem mit dem Prä-mRNA-Spleißen in Verbindung gebracht wird (Yun und Fu, 2000; Dagher und Fu, 2001), in seiner Rolle als essentieller, pendelnder mRNA-Exportfaktor jedoch am besten charakterisiert ist. Bei zahlreichen thermosensitiven *NPL3*-Mutanten akkumuliert nach einem Wechsel zur nicht-permissiven Temperatur Poly(A)⁺-RNA im Zellkern (Lee *et al.*, 1996). Krebber *et al.* (1999) zeigten zudem, dass Npl3p unter Stressbedingungen von der mRNA dissoziiert und diese Export-inkompetent im Zellkern hinterlässt und postulierten eine Funktion bei der Verpackung der mRNPs in die Transportkonformation.

Npl3p gleicht den authentischen SR-Proteinen strukturell in mehrfacher Hinsicht und weist sowohl zwei RRM's als auch eine RS-ähnliche, carboxyterminale Domäne auf (Abb. 4A) (Birney *et al.*, 1993). Wie von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen gezeigt wurde, phosphoryliert Sky1p ausschließlich eines der insgesamt acht relativ verstreut liegenden RS/SR-Dipeptide (Yun und Fu, 2000; Gilbert *et al.*, 2001). Eine Inaktivierung der vorwiegend zytoplasmatischen Kinase führt zu einer verringerten Bindung des Importrezeptors Mtr10p an das in der RS-ähnlichen Domäne enthaltene Kernlokalisierungssignal (Senger *et al.*, 1998; Yun und Fu, 2000; Gilbert *et al.*, 2001). Interessanterweise erhöht sich gleichzeitig die mRNA-Assoziation von Npl3p um ein Vielfaches. Aufgrund dieser und weiterer Beobachtungen postulierten Gilbert *et al.* (2001) eine Sky1p- und Mtr10p-vermittelte Ablösung von der mRNA (Abb. 4B). Umgekehrt ist für eine Dissoziation des Npl3p-Mtr10p-Komplexes im Zellkern neben RanGTP auch RNA erforderlich (Senger *et al.*, 1998). Nach neuesten Erkenntnissen bindet Npl3p die gerade entstehende Prä-mRNA im phosphorylierten Zustand und wird während der 3'-Prozessierung von einer nukleären Phosphatase

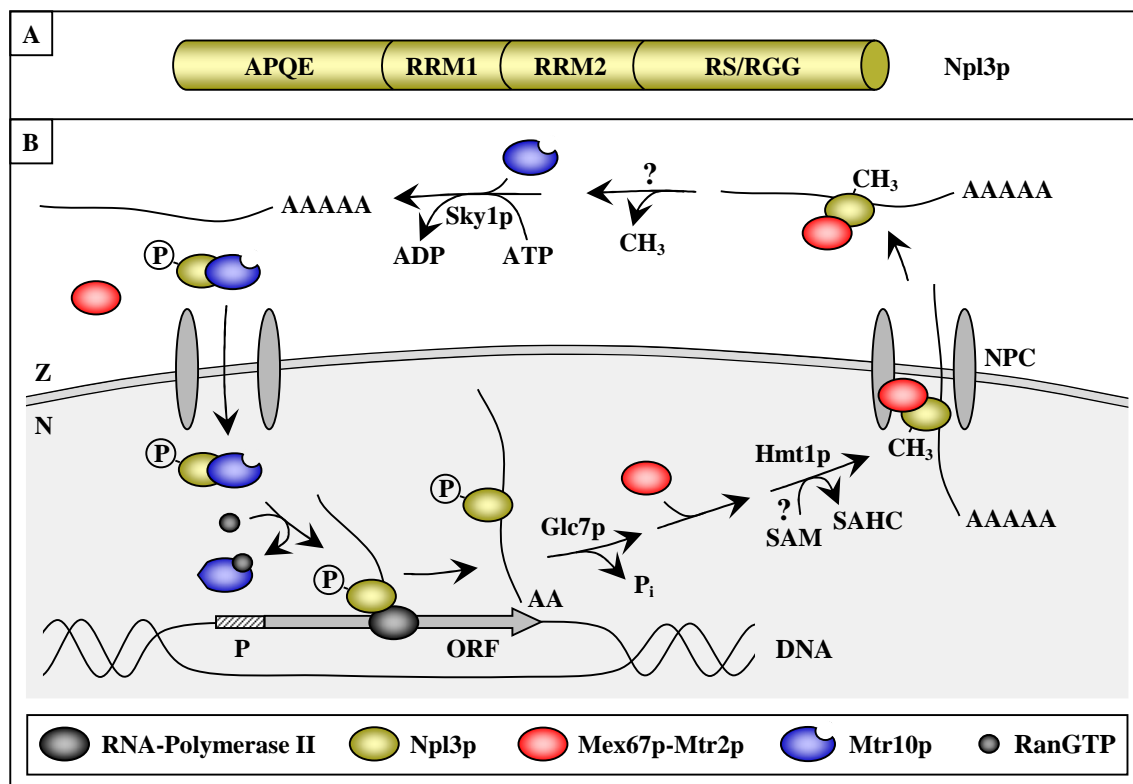


Abb. 4. Struktur und Funktionsmodell des mRNA-Exportfaktors Npl3p. **A:** Domänenstruktur von Npl3p. Der Aminoterminal des Proteins weist vier APQE-Sequenzen auf, seine Funktion ist unbekannt. Ihm schließen sich zwei RNA-Erkennungsmotive (RRMs) und eine RS/RGG-reiche Domäne an (modifiziert nach Bossie *et al.*, 1992). **B:** Modell des Funktionszyklus von Npl3p. Npl3p bindet die entstehenden Transkripte im phosphorylierten Zustand. Die 3'-Prozessierung stimuliert Glc7p zur Dephosphorylierung des Moleküls, welches daraufhin Mex67p-Mtr2p rekrutiert und so zur Bildung Export-kompetenter mRNPs beiträgt. Wann die nukleäre Methylierung von Npl3p erfolgt, weshalb auch sie den Export des Proteins fördert und ob es sich bei ihr um einen reversiblen Prozess handelt, ist nicht bekannt. Nach der Translokation wird Npl3p durch kombinierte Wirkung der SR-spezifischen Kinase Sky1p und des Importrezeptors Mtr10p von der mRNA gelöst. Im Zellkern zerfällt der Npl3p-Mtr10p-Komplex in Gegenwart von RanGTP und RNA. Der Übersichtlichkeit halber wurden weitere mRNA-Bindeproteine nicht dargestellt (modifiziert nach Izaurralde, 2004). A: Adenosin; N: Nukleoplasma; ORF: offener Leserahmen; P: Promotor; (P): Phosphatrest; P_i: anorganisches Phosphat; SAHC: S-Adenosylhomocystein; SAM: S-Adenosylmethionin; Z: Zytoplasma

namens Glc7p dephosphoryliert. Dieser Schritt initiiert eine direkte Interaktion mit dem Exportrezeptor Mex67p-Mtr2p. Npl3p erfüllt demnach die Funktion eines Adaptermoleküls, und die asymmetrische Verteilung seiner regulatorischen Enzyme leistet vermutlich einen Beitrag zur Direktionalität der mRNA-Exportprozesse (Abb. 3, Abb. 4B) (Gilbert und Guthrie, 2004; Izaurralde, 2004). In dem Zusammenhang ist auch die nukleäre Arginin-Methyltransferase Hmt1p („hnRNP methyltransferase“)/Rmt1p zu erwähnen, welche Npl3p an mehreren RGG-Sequenzen innerhalb der RS-ähnlichen Domäne methyliert und seine Exportrate erheblich steigert (Henry und Silver, 1996; Shen *et al.*, 1998). Nach einem Modell von Yun und Fu (2000) beeinträchtigt die Methylierung als Antagonist der Phosphorylierungsreaktion andererseits die zytoplasmatische Interaktion zwischen Npl3p und Mtr10p. Ob eine entsprechende Demethylierung im Zytoplasma stattfindet, ist derzeit ungeklärt.

2.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

In den letzten Jahren konnten rasante Fortschritte bei der Aufklärung des nukleären mRNA-Exports verzeichnet werden. Um ein immer detaillierteres Bild zu erhalten, ist das primäre Ziel momentan die Identifizierung und Charakterisierung sämtlicher an dem Prozess beteiligter Proteine. Hierbei macht man sich vielfach den niederen Eukaryonten *Saccharomyces cerevisiae* zunutze, welcher aufgrund seiner einfachen Struktur und experimentell guten Zugänglichkeit einen idealen Modellorganismus zur Erforschung komplexer Zusammenhänge darstellt.

Npl3p sticht aus den mRNA-Exportfaktoren von *S. cerevisiae* durch seine Homologie zu den SR-Proteinen höherer Eukaryonten hervor. Interessanterweise zeigen die Proteine Gbp2p („G-strand binding protein“) und Hrb1p („hypothetical RNA-binding protein“) eine vergleichbare Struktur und besitzen beide sowohl eine RS/RGG-ähnliche Domäne als auch drei RRM (Birney *et al.*, 1992; Konkel *et al.*, 1995; Senger *et al.*, 1998; Siebel *et al.*, 1999). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war Gbp2p ausschließlich in Zusammenhang mit Telomeren beschrieben worden. So erkennt das Protein spezifisch die einzelsträngige G-Strang-Telomersequenz $(TG_{1-3})_n$ *in vitro* (Lin und Zakian, 1994), beeinflusst die Lokalisierung des Telomer-assoziierten Proteins Rap1p *in vivo* (Konkel *et al.*, 1995) und reguliert nach neueren Erkenntnissen unter artifiziellen Bedingungen die Telomerlänge (Pang *et al.*, 2003). Hrb1p wurde von Senger *et al.* (1998) als Mtr10p-assoziiertes, putatives RNA-Bindeprotein charakterisiert. Shen *et al.* (1998) zeigten überdies, dass Hrb1p ebenso wie Npl3p in Abhängigkeit von der RNA-Polymerase II-Transkription zwischen Kern und Zytoplasma pendelt und *in vitro* von Hmt1p methyliert wird. Im Gegensatz zu Npl3p modifiziert eine Deletion von Hmt1p in diesem Fall jedoch nicht die Exportrate, außerdem wurden keine direkten experimentellen Hinweise auf eine mRNA-Bindung von Hrb1p erhalten.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte vorrangig Gbp2p einer genauen Charakterisierung mit besonderem Augenmerk auf eine potentielle Beteiligung am mRNA-Export unterzogen werden. Untersucht werden sollte weiterhin, ob das Protein aufgrund Familien-typischer Merkmale den SR- und SR-ähnlichen Proteinen zuzuordnen ist. Ferner war eine Fortführung der Charakterisierung von Hrb1p vorgesehen.

Um Einblicke in die zytoplasmatischen Umstrukturierungen der exportierten mRNPs zu erhalten, sollte im zweiten Teil der Frage nachgegangen werden, zu welchem Zeitpunkt und in welcher Reihenfolge die verschiedenen pendelnden mRNA-Bindeproteine dissoziieren. Hintergrund war hierbei unter anderem die Überlegung, dass spezifische Proteine den mRNA-Export möglicherweise über den NMD-Prozess hinaus mit der Translation koppeln.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte

| | |
|-----------------------|---|
| Mikroskope: | Leitz Aristoplan Fluoreszenz-Mikroskop (Leitz, Wetzlar) mit Digitalkamera Orca C4742-95 (Hamamatsu Photonics, Herrsching) und Computerprogramm HPD-CP Version 2.6.2.0 (Hamamatsu Photonics, Herrsching) Nikon Eclipse E400 mit Mikromanipulator (Nikon, Düsseldorf) Leitz Biomed Typ 020-507.010 (Leitz, Wetzlar) |
| Inkubatoren | |
| - Bakterien: | Schüttelinkubator AJ112 (Infors, Bottmingen/Schweiz) Brutschrank B6120 (Heraeus, Hanau) |
| - Hefe: | Schüttelinkubator Innova 4230 (New Brunswick Scientific, Edison/USA) Brutschrank BK-600 (Heraeus, Hanau) |
| Elektrophorese | |
| - Agarosegele: | Wide Mini Sub Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA) H110/88 (EMBL, Heidelberg) |
| - SDS-PAGE: | Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA) Modell V15.17 Gel Elektrophorese System (Biometra biomedizinische Analytik, Göttingen) |
| Zentrifugen: | Tischzentrifugen Biofuge Pico und Biofuge Fresco für 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße (Heraeus, Hanau) Kühlzentrifuge Multifuge 3L-R für PP-Röhrchen (Heraeus, Hanau) Kühlzentrifuge J2-21 M/E mit Rotor JS-13.1 (Beckman Instruments, Fullerton/USA) Kühlzentrifuge J-6 M/E mit Rotor JA-10 (Beckman Instruments, Fullerton/USA) Ultrazentrifuge L8-60M mit Rotor SW40 (Beckman Instruments, Fullerton/USA) Vakuumbzentrifuge SpeedVac SC100 (Savant Instruments, New York/USA) mit Gefrier-trocknungsanlage Leybold-Heraeus Lyovac GT2 (Heraeus, Hanau) und Drehschieber-Vakuumpumpe Typ RZ8 (Vacuubrand, Wertheim) |
| Netzgeräte: | Model 200/2.0 Power Supply (Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA) Model 100/200 Power Supply (Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA) LKB-ECPS 3000/150 (Amersham Biosciences Europe, Buckinghamshire/England) |
| Sonstige: | Dichtegradientenfraktionierer Isco Model 640 mit Durchflussphotometer, Absorptions-monitor Isco Model UA-5 (Isco, Lincoln/USA) und Fraktionssammler Gradientenmaschine Gradient Master (Nycomed Pharma, Unterschleißheim) PCR-Gerät Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research, Waltham/USA) Semi-Dry Blot-Apparatur Trans Blot SD (Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA) |

Photometer Spectra Max 340 (MWG-Biotech, Ebersberg) mit Computerprogramm Softmax Pro Version 1.2.0 (Molecular Devices, Ismaning/München) und Ultrospec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire/England)

UV-Transilluminator (IVP, San Gabriel/USA) mit Videokamera, Monitor und Videoprinter P68E (Mitsubishi, Japan)

Culture Tube Rotator SC1 (Stuart Scientific, Redhill/England)

Hämazytometer Neubauer improved (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen)

Gaspumpe Laboport (KNF Neuberger, Freiburg)

UV Stratalinker 2400 (Stratagene, La Jolla/USA)

Röntgenfilmentwickler X-Omat 2000 Processor (Kodak, Rochester/USA)

Wasserbäder SW-21C, beheizbar (Julabo, Seelbach) und Haake L, beheizbar (Thermo Haake, Karlsruhe)

Szintillationszähler LS1701 (Beckman Instruments, Fullerton/USA)

Mini Hybridisation Oven (Biometra biomedizinische Analytik, Göttingen)

Autoklav Bioclav (Schütt, Olching)

pH-Meter 764 Multi-Calimatic (Knick, Egelsbach)

Milli-Q Water Purification System (Millipore, Eschborn)

Waage Sartorius Laboratory (Sartorius, Göttingen) und Feinwaage Sartorius Research R200D (Sartorius, Göttingen)

Heizblöcke Dri-Block DB-3 (Technique, Duxford Cambridge/England) und TM 130-6 mit Schüttelfunktion (HLC)

Magnetrührer Ikamag Ret (IKA-Labortechnik, Staufen)

Vortex VF2 und Ika-Vibrax-VXR (IKA-Labortechnik, Staufen)

Stickstofftank Chronos Biosafe (Messer-Griesheim, Düsseldorf)

Mikrowelle Micromat (EHG Elektroholding, Frankfurt am Main)

3.2 Chemikalien

Substanz

Bezugsquelle

| | |
|---|--|
| γ ³² P-ATP, Redivue | Amersham Biosciences Europe, Buckinghamshire/England |
| Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids | Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA |
| BenchMark Prestained Protein Ladder | Life Technologies, Karlsruhe |
| Complete und Complete Mini, EDTA-free | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Coomassie brilliant blue R-250 | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen |
| Cycloheximid | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen |
| DAPI | Carl Roth, Karlsruhe |
| DEPC | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen |
| 1 kb DNA Ladder | Life Technologies, Karlsruhe |
| dNTPs | Peqlab Biotechnologie, Erlangen |
| 5-Fluoroorotsäure | Apollo Scientific Limited, Derbyshire/England |
| Glasperlen, 425-600 µm | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen |
| Heparin | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen |
| Heringssperma-Träger-DNA | Clontech, Palo Alto/USA |

| | |
|---|---|
| Hybond-N Nylonmembran | Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire/England |
| Immobilon-P Transfer Membran | Millipore, Eschborn |
| Oligo (dT)-Zellulose | New England Biolabs, Beverly/USA |
| PeqGold RNA Pure | Peqlab Biotechnologie, Erlangen |
| Polylysin | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen |
| Polyvinylpyrrolidon | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen |
| N-Propyl-Gallat | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen |
| Protease Inhibitor Cocktail | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen |
| Puromycin | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen |
| Ribonucleoside-Vanadyl Complex | New England Biolabs, Beverly/USA |
| RNasin Ribonuclease Inhibitor | Promega, Madison/USA |
| Triethanolamin | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen |
| tRNA | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen |
| Yeast synthetic dropout medium supplement | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen |

Alle übrigen Chemikalien wurden im höchsten Reinheitsgrad von folgenden Firmen bezogen: Difco, Kansas City/USA; Fluka Chemie, Deisenhofen; Gerbu Biotechnik, Gaiberg; Life Technologies, Karlsruhe; Merck, Darmstadt; Roche Diagnostics, Mannheim; Carl Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen.

3.3 Stämme

3.3.1 *Escherichia coli*-Stämme

Tab. 1. Genotyp des verwendeten Bakterienstammes. Die Bezeichnung des Genotyps entspricht der allgemeinen Nomenklatur für *E. coli* (Bachmann, 1983).

| <i>E. coli</i> -Stamm | Genotyp | Referenz/Quelle |
|-----------------------|--|------------------------------|
| TOP10F' | <i>F' {lacIq Tn10(TetR)} mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i> | Life Technologies, Karlsruhe |

3.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Tab. 2. Genotypen der verwendeten Hefestämme. Die Bezeichnungen der Genotypen entsprechen der allgemeinen Nomenklatur für *S. cerevisiae* (Sherman, 1981).

| <i>S. cerevisiae</i> -Stamm | Genotyp | Referenz/Quelle |
|-----------------------------|---|------------------------------|
| HKY15 | <i>npl3-27 MATα ura3 leu2 his3 lys1 trp1 ade2 ade8 can1</i> | Krebber <i>et al.</i> , 1999 |
| HKY28 | <i>rat7-1 npl3-27 MATα ura3 leu2 his3 ade8 + pURA 2μ</i> | Krebber <i>et al.</i> , 1999 |

| <i>S. cerevisiae</i> - Stamm | Genotyp | Referenz/Quelle |
|---------------------------------|---|---------------------------------|
| HKY29 | <i>npl3-27</i> <i>MATa ura leu his trp ade8 + pURA 2μ</i> | H. Krebber, Marburg |
| HKY35 | Wildtyp <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63</i> | Winston <i>et al.</i> , 1995 |
| HKY36 | Wildtyp <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200</i> | Winston <i>et al.</i> , 1995 |
| HKY46 | <i>mtr10-1</i> <i>MATa ura3-52 lys2-301 ade2</i> | Liu <i>et al.</i> , 1999 |
| HKY52 | <i>hmt1::HIS3 npl3-27</i> <i>MATa ura3 leu2 his3 lys1 trp</i> | Windgassen und Krebber, 2003 |
| HKY53 | <i>hmt1::HIS3</i> <i>MATa ura3 leu2 his3 lys1</i> | Windgassen und Krebber, 2003 |
| HKY76 | <i>rpb1-1 npl3-27</i> <i>MATa ura3 his3 trp1 ade</i> | H. Krebber, Marburg |
| HKY77 | <i>rpb1-1</i> <i>MATa ura his trp</i> | R. A. Young, Cambridge/USA |
| HKY86 | <i>kap104::HIS3</i> <i>MATa ura leu his lys + pKAP104 URA</i> | M. Seedorf, Heidelberg |
| HKY89 | <i>rat8-1 npl3-27</i> <i>MATa ura leu trp lys ade</i> | H. Krebber, Marburg |
| HKY90 | <i>rat8-1</i> <i>MATa ura leu</i> | H. Krebber, Marburg |
| HKY97 | <i>mtr10::HIS3</i> <i>MATa ura3 leu2 his3 lys1 ade</i> <i>+ pMTR10 URA3 CEN</i> | Krebber <i>et al.</i> , 1999 |
| HKY100 | <i>mex67::HIS3 npl3-27</i> <i>MATa ura3 leu2 his3 lys1 ade</i> <i>+ pmex67-5-GFP LEU2 CEN</i> | H. Krebber, Marburg |
| HKY124 | <i>rat7-1</i> <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200</i> | C. N. Cole, Hanover/USA |
| HKY133 | <i>kap123::HIS3</i> <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200</i> | Seedorf und Silver, 1997 |
| HKY138 | <i>pse1-1</i> <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63</i> | Seedorf und Silver, 1997 |
| HKY157 | <i>npl3::HIS3</i> <i>MATa ura3 leu2 his3 lys1 ade</i> <i>+ pNPL3-myc URA3 CEN</i> | P. A. Silver, Boston/USA |
| HKY181 | <i>HRB1-GFP:TRP1</i> <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63</i> | H. Krebber, Marburg |

| <i>S. cerevisiae</i> -Stamm | Genotyp | Referenz/Quelle |
|-----------------------------|--|--------------------------------|
| HKY183 | <i>mtr2-142 npl3-27</i> <i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his3 trp1-1 ade2 ade8</i> | H. Krebber, Marburg |
| HKY184 | <i>mtr2-142</i> <i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his3 lys1-1 ade2-1 ade8 can1-100</i> | Lei <i>et al.</i> , 2003 |
| HKY194 | <i>hrb1::HIS3</i> <i>MATa ura3 leu2 his3 lys1 trp1-1 ade2 ade8 can1-100</i> | Shen <i>et al.</i> , 1998 |
| HKY257 | <i>gbp2::HIS3</i> <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200</i> | H. Krebber, Marburg |
| HKY267 | <i>sky1::TRP1</i> <i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 ade3 can1-100</i> | Siebel <i>et al.</i> , 1999 |
| HKY268 | Wildtyp <i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 ade3 can1-100</i> | Siebel <i>et al.</i> , 1999 |
| HKY270 | <i>mtr10::HIS3</i> <i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 ade2</i> + <i>pmtr10-7 TRP1 CEN6 ARS4</i> | Senger <i>et al.</i> , 1998 |
| HKY271 | <i>mtr10::HIS3</i> <i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 ade2</i> + <i>pMTR10 URA3 CEN6 ARS4</i> | Senger <i>et al.</i> , 1998 |
| HKY280 | <i>PAB1-GFP:KAN</i> <i>MATa ura3-52 leu2 trp1 pep4-3 pre1-407 prb1-1122</i> | Zenklusen <i>et al.</i> , 2001 |
| HKY295 | <i>kap104::ura::HIS</i> <i>MATa ura leu lys trp</i> + <i>pkap104-16 TRP1 CEN6 ARS4</i> | Aitchison <i>et al.</i> , 1996 |
| HKY315 | <i>mex67::HIS3</i> <i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 ade2</i> + <i>pmex67-5-ProtA LEU2 CEN4 ARS1</i> | Segref <i>et al.</i> , 1997 |
| HKY351 | <i>npl3-27</i> <i>MATa ura leu his trp ade</i> | diese Arbeit (3.11.6) |
| HKY352 | Wildtyp <i>MATa ura leu his trp</i> | diese Arbeit (3.11.6) |

3.4 Plasmide

Tab. 3. Auflistung der verwendeten Vektoren und rekombinanten Plasmide.

| Vektoren und rekombinante Plasmide | Charakterisierung | Referenz/Quelle |
|------------------------------------|--|-------------------------------------|
| pHK12 | P_{ADH}:NLS-NES-GFP-GFP URA3 CEN6 ARS4 Amp ^r | Taura <i>et al.</i> , 1998 |
| pHK13 | P_{MTR10}:MTR10 URA3 2 μ Amp ^r Tet ^r | A. M. Tartakoff, Cleveland/USA |
| pHK20 | P_{MEX67}:MEX67-GFP LEU2 CEN4 ARS1 Amp ^r | Segref <i>et al.</i> , 1997 |
| pHK33 | P_{NOPI}:GFP-MTR10 LEU2 CEN4 ARS1 Amp ^r | Senger <i>et al.</i> , 1998 |
| pHK50 | Amp ^r | Stratagene, La Jolla/USA |
| pHK68 | URA3 2 μ Amp ^r Tet ^r | New England Biolabs, Beverly/USA |
| pHK104 | URA3 2 μ Amp ^r | Sikorski und Hieter, 1989 |
| pHK110 | URA3 ADE3 2 μ Amp ^r | Costa und Arndt, 2000 |
| pHK144 | P_{GALI}:GFP-NPL3 URA3 2 μ Amp ^r | Lee <i>et al.</i> , 1996 |
| pHK155 | P_{NPL3}:npl3-26 LEU2 CEN4 ARS1 Amp ^r | P. A. Silver, Boston/USA |
| pHK194 | P_{NPL3}:npl3-1 LEU2 CEN4 ARS1 Amp ^r | Henry <i>et al.</i> , 1996 |
| pHK196 | P_{NPL3}:NPL3 URA3 ADE3 2 μ Amp ^r | Lee <i>et al.</i> , 1996 |
| pHK231 | P_{GALI}:GFP URA3 2 μ Amp ^r | P. A. Silver, Boston/USA |
| pHK235 | P_{GALI}:HRB1-GFP URA3 2 μ Amp ^r | Shen <i>et al.</i> , 1998 |
| pHK241 | P_{GALI}:GFP-YRB2 URA3 2 μ Amp ^r | Taura <i>et al.</i> , 1998 |
| pHK258 | P_{CBP80}:CBP80-GFP URA3 2 μ Amp ^r | Shen <i>et al.</i> , 2000 |
| pHK260 | P_{RAT8}:RAT8-myc LEU2 CEN4 ARS1 Amp ^r Tet ^r | Snay-Hodge <i>et al.</i> , 1998 |
| pHK356 | P_{NAB2}:NAB2-GFP URA3 CEN6 ARS4 Amp ^r | Duncan <i>et al.</i> , 2000 |
| pHK358 | P_{GALI}:NAB2-GFP LEU2 CEN6 ARS4 Amp ^r | Duncan <i>et al.</i> , 2000 |

| Vektoren und rekombinante Plasmide | Charakterisierung | Referenz/Quelle |
|------------------------------------|---|------------------------------|
| pHK367 | P_{GBP2}:GBP2-GFP URA3 CEN6 ARS4 Amp ^r | H. Krebber, Marburg |
| pHK385 | P_{GALI}:GBP2-GFP URA3 CEN6 ARS4 Amp ^r | diese Arbeit (3.10.12) |
| pHK389 | P_{GBP2}:gbp2(Δ4-297)-GFP URA3 CEN6 ARS4 Amp ^r | diese Arbeit (3.10.12) |
| pHK404 | P_{GBP2}:GBP2 Amp ^r | diese Arbeit (3.10.12) |
| pHK407 | P_{GBP2}:GBP2 URA3 ADE3 2 μ Amp ^r | diese Arbeit (3.10.12) |
| pHK408 | P_{HRB1}:HRB1-GFP URA3 2 μ Amp ^r | diese Arbeit (3.10.12) |
| pHK412 | P_{GBP2}:gbp2(S13/15/17A)-GFP URA3 CEN6 ARS4 Amp ^r | diese Arbeit (3.10.12) |
| pHK414 | P_{MTR10}:MTR10 LEU2 CEN4 ARS1 Amp ^r | Senger <i>et al.</i> , 1998 |
| pHK418 | P_{NPL3}:GFP-NPL3 LEU2 CEN6 ARS4 Amp ^r | Gilbert <i>et al.</i> , 2001 |
| pHK422 | P_{GALI}:GBP2-GFP URA3 2 μ Amp ^r | diese Arbeit (3.10.12) |
| pHK431 | P_{GBP2}:gbp2(S15A)-GFP URA3 CEN6 ARS4 Amp ^r | diese Arbeit (3.10.12) |
| pHK432 | P_{GBP2}:gbp2(S17A)-GFP URA3 CEN6 ARS4 Amp ^r | diese Arbeit (3.10.12) |
| pHK446 | P_{GBP2}:gbp2(S13A)-GFP URA3 CEN6 ARS4 Amp ^r | diese Arbeit (3.10.12) |
| pHK508 | P_{GBP2}:gbp2(S13/15/17A)-GFP TRP1 CEN6 ARS4 Amp ^r | H. Krebber, Marburg |
| pHK513 | P_{ADH}:SV40NLS-GFP-GFP URA3 CEN6 ARS4 Amp ^r | M. Seedorf, Heidelberg |
| pHK537 | P_{HRB1}:HRB1-GFP URA3 CEN6 ARS4 Amp ^r | Häcker und Krebber, 2004 |

3.5 Oligonukleotide

Als Startermoleküle für die Polymerasekettenreaktionen (3.10.3; 3.14.3) und Sequenzierungen (3.10.11) wurden die in Tab. 4 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Diese

wurden HPLC-gereinigt von den Firmen MWG-Biotech, Ebersberg und Metabion, Planegg-Martinsried bezogen.

Tab. 4. Auflistung der verwendeten Oligonukleotide. Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen und Mutation-einführende Sequenzen fettgedruckt dargestellt. nt: Nukleotide

| Oligonukleotid | Nukleotidsequenz | Länge (nt) |
|----------------|--|------------|
| HK48 | 5' -GAAATAAGCTATGGG- 3' | 15 |
| HK50 | 5' -CCATCGATGCATGCCTTGGCGAAAAAATCCA GC- 3' | 33 |
| HK52 | <i>XhoI</i> 5' -CCCGCTCGAGAATCACGTCTAGCATAAG- 3' | 28 |
| HK81 | 5' -ATCACCATCTAATTC- 3' | 15 |
| HK91 | 5' -GCAATGGTGGTTAAC- 3' | 15 |
| HK92 | 5' -GGACGCGGTGGCGGT- 3' | 15 |
| HK93 | 5' -CGGATTTTCAAGAGG- 3' | 15 |
| HK115 | <i>XbaI</i> 5' -GCTCTAGATGGAACTTTCAGTAATACGC- 3' | 28 |
| HK116 | <i>EcoRI</i> 5' -GGAATTCTATAGTTTTTCTCCTTGAC- 3' | 27 |
| HK123 | <i>EcoRI</i> 5' -GGAATTCATGACTTTAGGTCCAATTGTTG- 3' | 29 |
| HK124 | <i>BamHI</i> 5' -CGGGATCCGAACCTGATGAATTGGGCAAC- 3' | 29 |
| HK125 | <i>BamHI</i> 5' -CGGGATCCAACAACTCTTCATACTCG- 3' | 27 |
| HK128 | 5' -ACGCCCTTCTCTAAC- 3' | 15 |
| HK130 | <i>EcoRI</i> 5' -GGAATTCATGGAGAGAGAGCTAGGGATGTAT GGAAATGATAGGGCTAGAGCAAGAGCACCTG- 3' | 62 |
| HK131 | <i>ClaI</i> 5' -CCATCGATAGCTCTAATCATTTTCATCCTC- 3' | 29 |
| HK157 | <i>EcoRI</i> 5' -GGAATTCAAAAAGTAGAGTACTGGCTG- 3' | 27 |
| HK158 | <i>PstI</i> 5' -AACTGCAGCCGACGACGAACAGGTGATC- 3' | 28 |
| HK165 | <i>EcoRI</i> 5' -GGAATTCATGGAGAGAGAGCTAGGGATGTAT GGAAATGATAGGGCTAGATC- 3' | 51 |
| HK166 | <i>EcoRI</i> 5' -GGAATTCATGGAGAGAGAGCTAGGGATGTAT GGAAATGATAGGAGTAGAGCAAGATC- 3' | 57 |
| HK167 | <i>EcoRI</i> 5' -GGAATTCATGGAGAGAGAGCTAGGGATGTAT GGAAATGATAGGAGTAGATCAAGAGCACCTG- 3' | 62 |

| Oligonukleotid | Nukleotidsequenz | Länge (nt) |
|----------------|-----------------------------------|------------|
| HK225 | 5' -GGATCCATGGCTAGCAAAGGAGA-3' | 23 |
| HK226 | 5' -ATGCATTTATTTGTATAGTTCATCCA-3' | 26 |
| HK267 | 5' -GCGCCTGTCGACAACA-3' | 16 |
| HK268 | 5' -CTCGAGTGCTTTTGCTAAC-3' | 19 |

3.6 Enzyme und Antikörper

Enzym

Alkalische Phosphatase (CIAP)
 Nuklease von *Staphylococcus aureus*
Pfu-DNA-Polymerase
 Ribonuklease A
 T4-DNA-Ligase
 T4-DNA-Polymerase
 T4-Polynukleotid-Kinase
Taq-DNA-Polymerase
 Zymolase 20T

Bezugsquelle

Life Technologies, Karlsruhe
 MBI Fermentas, Vilnius/Litauen
 Stratagene, La Jolla/USA
 Qiagen, Hilden
 Promega, Madison/USA
 MBI Fermentas, Vilnius/Litauen
 Life Technologies, Karlsruhe
 Roche Diagnostics, Mannheim
 Seikagaku, Tokyo/Japan

Restriktionsenzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: MBI Fermentas, Vilnius/Litauen; New England Biolabs, Beverly/USA; Life Technologies, Karlsruhe; Roche Diagnostics, Mannheim.

Tab. 5. Auflistung der verwendeten Antikörper. IB: Immunoblot; IF: indirekte Immunfluoreszenz

| Antikörper | eingesetzte Verdünnung | | Bezugsquelle |
|---|------------------------|-----------|---|
| | IB | IF | |
| Kaninchen-Anti-GFP | 1 : 5.000 | - | P. A. Silver, Boston/USA |
| Kaninchen-Anti-Hrp1p | 1 : 10.000 | - | P. A. Silver, Boston/USA |
| Kaninchen-Anti-Npl3p | 1 : 2.000 | 1 : 1.000 | P. A. Silver, Boston/USA |
| Kaninchen-Anti-Rps3p | 1 : 200.000 | - | M. Seedorf, Heidelberg |
| Kaninchen-Anti-Yrb1p | 1 : 10.000 | - | P. A. Silver, Boston/USA |
| Maus-Anti-myc 9B11 | 1 : 5.000 | - | Cell Signaling Technology, Beverly/USA |
| Ziege-Anti-Kaninchen FITC-Konjugat | - | 1 : 100 | Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove/USA |

| Antikörper | eingesetzte Verdünnung | | Bezugsquelle |
|--|------------------------|---------|--|
| | IB | IF | |
| Ziege-Anti-Kaninchen HRP-Konjugat | 1 : 3.000 | - | Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove/USA |
| Ziege-Anti-Kaninchen TRSC-Konjugat | - | 1 : 100 | Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove/USA |
| Ziege-Anti-Maus HRP-Konjugat | 1 : 3.000 | - | Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove/USA |

3.7 Reaktions- und Nachweissysteme

| System | Bezugsquelle |
|--|---|
| ECL Western Blotting detection reagents | Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire/England |
| ECL Plus Western Blotting detection reagents | Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire/England |
| NucleoSpin Extract 2 in 1 | Macherey-Nagel, Düren |
| NucleoBond AX 100 | Macherey-Nagel, Düren |
| OneStep RT-PCR Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAquick Nucleotide Removal Kit | Qiagen, Hilden |
| RC DC Protein Assay | Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA |

Soweit nicht anders an entsprechender Stelle vermerkt, wurden alle Reaktions- und Nachweissysteme nach den Angaben des jeweiligen Herstellers angewendet.

3.8 Computerprogramme und Datenbanken

DNA- und Proteinsequenzen wurden den Internet-Datenbanken „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und „Saccharomyces Genome Database“ (SGD) (<http://www.yeastgenome.org>) entnommen und mit dem Lasergene-Programmpaket der Firma DNASTAR, Madison/USA analysiert.

Die Quantifizierung von Röntgenfilm-Schwärzungen geschah mit Hilfe des Programms „Image Gauge 3.01“ der Firma Fujifilm, Tokyo/Japan.

3.9 Kultivierung von Bakterien und Hefen

Zur Herstellung von Festmedium wurde dem entsprechenden Flüssigmedium 3 % (w/v) Agar zugesetzt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Nährmedien für 20 min bei 200 kPa autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wie Antibiotika wurden vor ihrer Verwendung sterilfiltriert (Bottle Top-Filter, 0,2 µm Porengröße (Nunc, Wiesbaden) oder Einmalfilter FP030/3, 0,2 µm Porengröße (Schleicher & Schuell, Dassel)) und dem autoklavierten Medium zugesetzt.

3.9.1 Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium (pH 7,5) (Sambrook *et al.*, 1989)

| | | |
|-----|---------|-------------|
| 1 | % (w/v) | Pepton |
| 0,5 | % (w/v) | Hefeextrakt |
| 1 | % (w/v) | NaCl |

α-Komplementations-Platten (Sambrook *et al.*, 1989)

| | | |
|-----|----|-----------------------------------|
| 1 | ml | 100 mM IPTG in 70 % (v/v) Ethanol |
| 5 | ml | 2 % (w/v) X-Gal in DMF |
| 300 | ml | LB-Agar |

SOB-Medium (Inoue *et al.*, 1990)

| | | |
|-----|---------|-------------------|
| 2 | % (w/v) | Pepton |
| 0,5 | % (w/v) | Hefeextrakt |
| 10 | mM | NaCl |
| 10 | mM | MgSO ₄ |
| 10 | mM | MgCl ₂ |

Das SOB-Medium wurde sterilfiltriert.

Zur Selektion von plasmidkodierten Resistenzen wurden die Medien durch Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml ergänzt.

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei 37 °C. Submerskulturen wurden mit Einzelkolonien von Agarplatten beimpft und in einem Schüttelinkubator (3.1) bei 180 UpM bebrütet. Übernachtskulturen wurden mindestens 16 h inkubiert. Zelldichten wurden durch Trübungsmessung in einem Spektralphotometer (3.1)

bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen das entsprechende Medium als Referenz ermittelt. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht hierbei einem Titer von ca. 2×10^8 *E. coli*-Zellen/ml.

3.9.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

YPD-Medium (Rose *et al.*, 1990)

| | | |
|---|---------|-------------|
| 1 | % (w/v) | Hefeextrakt |
| 2 | % (w/v) | Pepton |
| 2 | % (w/v) | Glukose |

Nährstoff-Mangelmedien (Rose *et al.*, 1990)

| | | |
|-----|---------|---|
| 0,7 | % (w/v) | “Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids” |
| 0,2 | % (w/v) | “Yeast synthetic dropout medium supplement” |
| 2 | % (w/v) | Glukose |

Zur Selektion eines plasmid- oder genomlokalisierten Markergens, das eine Stoffwechsel-auxotrophie des Hefestammes komplementierte, wurde das Nährstoff-Mangelmedium so gewählt, dass es das Produkt des jeweiligen Stoffwechselweges nicht enthält.

Super-SPO-Medium (Rose *et al.*, 1990)

| | | | |
|------------------|-----|---------|--------------|
| <u>Lösung 1:</u> | 0,5 | % (w/v) | Hefeextrakt |
| | 306 | mM | Kaliumacetat |

| | | | |
|------------------|-----|----|--------------|
| <u>Lösung 2:</u> | 5 | mM | Glukose |
| | 0,4 | mM | Adenin |
| | 0,7 | mM | Uracil |
| | 0,4 | mM | Tyrosin |
| | 0,2 | mM | Histidin |
| | 0,3 | mM | Leucin |
| | 0,2 | mM | Lysin |
| | 0,2 | mM | Tryptophan |
| | 0,3 | mM | Methionin |
| | 0,2 | mM | Arginin |
| | 1,2 | mM | Phenylalanin |
| | 5,9 | mM | Threonin |

Nach dem Autoklavieren von Lösung 1 und dem Sterilfiltrieren von Lösung 2 wurden beide Lösungen im Verhältnis 1:1 zusammengegeben.

FOA-Platten (Rose *et al.*, 1990)

| | | |
|------|---------|--|
| 0,7 | % (w/v) | “Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids” |
| 0,2 | % (w/v) | “Yeast synthetic dropout medium supplement” ohne Uracil |
| 0,45 | mM | Uracil |
| 0,1 | % (w/v) | 5-Fluoroorotsäure |
| 2 | % (w/v) | Glukose |
| 3 | % (w/v) | Agar |

Das Medium wurde sterilfiltriert und dem Agar nach dem Autoklavieren zugesetzt.

FOA-Platten konnten zur Selektion Uracil-auxotropher Zellen verwendet werden, da das Produkt des Gens *URA3* 5-Fluoroorotsäure zu der toxischen Substanz 5-Fluorouracil metabolisiert (Boeke *et al.*, 1987).

Die verwendeten Hefestämme wurden standardmäßig bei 25 °C kultiviert. Submerskulturen wurden mit Einzelkolonien von Agarplatten oder mit Teilen einer Vorkultur beimpft. Kulturvolumina bis zu 10 ml wurden in einem Brutroller (3.1), größere in Erlenmeyerkolben auf einem Schüttelinkubator (3.1) bei 130 UpM bebrütet. Übernachtskulturen wurden mindestens 16 h inkubiert. Für Gefrierkulturen wurden logarithmisch wachsende Zellen in 50 % (v/v) Glycerin resuspendiert und bei -80 °C gelagert. Zelldichten wurden durch Auszählen in einem Hämazytometer (3.1) oder durch Trübungsmessung in einem Spektralphotometer (3.1) bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen das entsprechende Medium als Referenz ermittelt. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht hierbei einem Titer von ca. 4×10^7 *S. cerevisiae*-Zellen/ml.

Zur Induktion des Glukose-reprimierbaren *GALI*-Promotors wurden die Zellen bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($1-3 \times 10^7$ Zellen/ml bzw. OD₆₀₀ = 0,5) in Nährstoff-Mangelmedium bebrütet, welches 2 % (w/v) Raffinose anstelle von Glukose als Kohlenstoffquelle aufwies. Anschließend erfolgte die Induktion durch Zugabe von 2 % (w/v) Galaktose.

3.10 Methoden zur *in vitro*-Rekombination von DNA

3.10.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3.10.1.1 Analytische Präparation von Plasmid-DNA (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979)

| | | |
|------------------------|-------------|--------------|
| <u>Mix I (pH 8,0):</u> | 50 mM | Glukose |
| | 25 mM | Tris/HCl |
| | 10 mM | EDTA |
| <u>Mix II:</u> | 200 mM | NaOH |
| | 1 % (w/v) | SDS |
| <u>Mix III:</u> | 2,5 M | Kaliumacetat |
| | 9,6 % (v/v) | Essigsäure |

Zur Analyse von Bakterienklonen nach einer Transformation (3.10.10) wurden Zellen aus 5 ml einer Übernachtskultur (3.9.1) durch Zentrifugation (5 min, $3.800 \times g$, RT) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 100 μ l Mix I resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 μ l Mix II, die Probe wurde durch Invertieren vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 100 μ l eiskaltem Mix III, einer erneuten Durchmischung und 5 min Inkubation auf Eis wurden durch alkalische Lyse freigesetzte Proteine und genomische DNA gefällt. Zelltrümmer und das Präzipitat wurden durch Zentrifugation (5 min, $16.100 \times g$, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde mit 400 μ l Phenol-Chloroform-Amylalkohol (25:24:1) versetzt. Nach intensivem Mischen wurden die Phasen durch Zentrifugation (5 min, $16.100 \times g$, RT) separiert. Die wässrige, von Proteinresten befreite Oberphase wurde überführt und mit 800 μ l Ethanol (abs.) vermischt. Während einer 10 min Inkubation auf Eis fiel die DNA als Kaliumsalz aus, da die Hydrathülle durch den Alkohol entzogen wurde. Die präzipitierte Plasmid-DNA wurde sedimentiert (5 min, $16.100 \times g$, RT), bei RT luftgetrocknet und in 20 μ l A. dest. aufgenommen. Schließlich erfolgte die Zugabe von 1 μ l Ribonuklease A (10 mg/ml) (3.6) bevor die Lösung bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert wurde.

3.10.1.2 Quantitative Säulenpräparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA von hohem Reinheitsgrad für Klonierungen (3.10.5 - 3.10.9) und Sequenzierungen (3.10.11) wurde das auf Säulen-

chromatographie basierende Reaktionssystem „NucleoBond AX 100“ (3.7) verwendet. Die Vorgehensweise orientierte sich am Protokoll des Herstellers.

3.10.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA in wässriger Lösung wurde spektralphotometrisch (3.1) gegen A. dest. als Referenz ermittelt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml an doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

Unbekannte DNA-Mengen in Agarosegelen (3.10.7) wurden mit Hilfe des Molekulargewichtsstandards abgeschätzt. Laut Herstellerangaben entfallen bei der „1 kb DNA Ladder“ (3.2) 10 % der gesamten DNA-Menge des Standards auf die 1,6 kb-Bande.

3.10.3 Polymerasekettenreaktion

Polymerasekettenreaktionen („polymerase chain reactions“, PCRs) dienten der *in vitro*-Amplifizierung von DNA-Sequenzen aus *S. cerevisiae*, die für Klonierungen (3.10.5 - 3.10.9) benötigt wurden. Mit Hilfe dieser Methode konnten auch Punktmutationen und Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in die entstehenden DNA-Fragmente eingeführt werden. Synthetisierte Oligonukleotide (3.5) dienten als Startermoleküle, und die Amplifizierung erfolgte vorzugsweise unter Verwendung der thermostabilen, DNA-abhängigen DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (3.6). Diese weist eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und eine darauf basierende Korrekturlesefunktion auf (Lundberg *et al.*, 1991). Erbrachte die *Pfu*-Polymerase kein spezifisches Produkt, so wurde die ebenfalls thermostabile und DNA-abhängige DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (3.6) verwendet, die keine Korrekturlesefunktion besitzt. Sofern nach Durchführung einer Standard-PCR-Reaktion kein spezifisches Produkt detektiert werden konnte, wurde auf eine „Touchdown“-PCR zurückgegriffen. Kontrollansätzen wurde keine Matrizen-DNA zugesetzt.

3.10.3.1 Standard-PCR-Reaktion (modifiziert nach Saiki *et al.*, 1988)

Die Reaktionen wurden mit dem PCR-Gerät „Peltier Thermal Cycler PTC-200“ (3.1) mit den in Tab. 6 aufgeführten Reaktionskomponenten und unter den in Tab. 7 zusammengefassten Parametern durchgeführt. Die Dauer der Verlängerungsphase richtete sich nach der verwendeten DNA-Polymerase und der Länge der zu amplifizierenden Sequenz: bei Einsatz der *Pfu*-Polymerase wurde mit 2 min, bei Einsatz der *Taq*-Polymerase mit 1 min für den Einbau von 1.000 Nukleotiden gerechnet. Die Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen betrug 35. Dem ersten Zyklus ging eine 1 min Denaturierung bei 95 °C voran, dem letzten Zyklus schloss sich eine Verlängerung von 5 min bei 72 °C an.

Tab. 6. Konzentrationen der Reaktionskomponenten bei Standard-PCR-Reaktionen.
Nicht absolute Angaben beziehen sich auf ein Reaktionsvolumen von 50 µl.

| Reaktionskomponente | Konzentration |
|---------------------|--|
| Oligonukleotid 1 | 3 µM |
| Oligonukleotid 2 | 3 µM |
| Polymerase-Puffer | 1 × <i>Pfu</i> - bzw. <i>Taq</i> -Puffer |
| dNTP-Mix | 200 µM pro dNTP |
| DNA-Polymerase | 2,5 U <i>Pfu</i> - bzw. 5 U <i>Taq</i> -Polymerase |
| Matrizen-DNA | 100 ng chromosomale DNA oder 10 ng Plasmid-DNA |

Tab. 7. PCR-Programm zur Durchführung von Standard-PCR-Reaktionen.

| | Temperatur (°C) | Zeit (min) |
|-----------------------|-----------------|------------|
| Denaturierung | 95 | 0,5 |
| Hybridisierung | 55 | 0,5 |
| Verlängerung | 72 | 1 bis 4 |

3.10.3.2 „Touchdown“-PCR-Reaktion (modifiziert nach Don *et al.*, 1991)

Zur Erhöhung der Spezifität wurde eine „Touchdown“-PCR-Reaktion (TD-PCR) durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur wurde hierbei in den ersten 22 Zyklen ausgehend von 72 °C in jedem Zyklus um 1 °C abgesenkt. Es schlossen sich weitere 10 Zyklen bei einer Hybridisierungstemperatur von 50 °C an. Das gewählte Programm war dem der Standard-PCR (3.10.3.1) analog und wurde lediglich bezüglich der Hybridisierungstemperaturen modifiziert. Durch unspezifische Hybridisierung von Startermolekülen gebildete PCR-Produkte sollten hierbei in den ersten Zyklen vermieden werden. Bei den niedrigeren Hybridisierungstemperaturen in den darauffolgenden Zyklen sollten die unspezifischen Produkte aufgrund der exponentiellen Natur der PCR keine nennenswerten Kontaminationen mehr bilden.

3.10.4 DNA-Reinigung

PCR-Produkte (3.10.3) und DNA-Moleküle aus weiteren enzymatischen Reaktionsansätzen wurden über präparative Agarosegele (3.10.7) mit anschließender Gelelution (3.10.8) oder säulenchromatographisch unter Verwendung des „NucleoSpin Extract 2 in 1“-Reaktionssystems (3.7) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

3.10.5 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur gezielten Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen innerhalb spezifischer DNA-Sequenzen wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II eingesetzt (3.6). Zur vollständigen Hydrolyse wurden pro μg DNA 5 bis 10 U der entsprechenden Endonuklease in den Restriktionsansatz eingebracht und dieser 1 h bis ü.N. bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert. Für optimale Bedingungen wurden die mitgelieferten Puffer eingesetzt. Die Reaktionsvolumina betrugen im analytischen Maßstab bei Einsatz von bis zu 250 ng DNA 20 μl . In präparativen Maßstäben wurden die Volumina entsprechend der eingesetzten DNA-Menge vergrößert.

3.10.6 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Um Re-Ligationen zu verhindern, wurde linearisierte Vektor-DNA vor dem Einsatz in eine Ligationsreaktion (3.10.9) am 5'-Ende dephosphoryliert. Hierzu wurde der Restriktionsansatz (3.10.5) nach Beendigung der Restriktion mit 1 U alkalischer Phosphatase (CIAP) (3.6) versetzt und nach Angaben des Enzym-Herstellers inkubiert.

3.10.7 Agarose-Gelelektrophorese von DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

| | | |
|----------------------------|--------------|----------------------|
| <u>TAE-Puffer:</u> | 40 mM | Tris/HCl |
| | 0,1 % (v/v) | Essigsäure |
| | 1 mM | EDTA |
| <u>Probenpuffer (5 ×):</u> | 3 mM | EDTA (pH 8,0) |
| | 25 % (w/v) | Ficoll (Typ 400) |
| | 0,25 % (w/v) | Bromphenolblau (BPB) |
| | 0,25 % (w/v) | Xylencyanol FF |

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA nach Restriktionen (3.10.5) und PCR-Reaktionen (3.10.3; 3.14.3) sowie zur Quantifizierung linearisierter DNA (3.10.2) durchgeführt. Des weiteren diente sie zur präparativen Isolierung definierter DNA-Moleküle (3.10.8). Je nach Größe der zu separierenden Moleküle wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,8 und 2,0 % (w/v) verwendet. Pro ml in 1 × TAE-Puffer aufgekochter Agarose wurden 0,5 μg Ethidiumbromid zugesetzt. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern (3.1) mit einer angelegten Spannung von bis zu 11 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt. Als Laufpuffer fand 1 × TAE-Puffer Verwendung. Die DNA-haltigen Proben wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer (5 ×) versetzt und zusammen

mit dem Molekulargewichtsstandard „1 kb DNA Ladder“ (3.2) auf das Agarosegel aufgetragen. Das Ergebnis der Elektrophorese wurde auf einem UV-Transilluminator analysiert und mittels einer Videodokumentationsanlage (3.1) festgehalten.

3.10.8 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Molekülen definierter Größe aus einem Agarosegel (3.10.7) erfolgte säulenchromatographisch unter Verwendung des „NucleoSpin Extract 2 in 1“-Reaktionssystems (3.7) nach dem Protokoll des Herstellers.

3.10.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung rekombinanter Plasmide wurden DNA-Fragmente durch das Enzym T4-DNA-Ligase (3.6) mit adäquat restringierter Vektor-DNA kovalent verbunden. Phosphodiester-Bindungen können von dem Enzym entweder zwischen kompatiblen kohäsiven oder glatten Enden gebildet werden. In beiden Fällen wurde die Vektor-DNA mit einer Endkonzentration von 100 ng/Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Konzentration der DNA-Fragmente stand in einem molaren Verhältnis von 2:1 zur Vektor-DNA. Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 10 µl. Jeweils 2 U der Ligase wurde im mitgelieferten Puffer eingesetzt und der Ansatz ü.N. bei 16 °C inkubiert.

3.10.10 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

| | | |
|----------------------------|--------|-------------------|
| <u>TB-Puffer (pH 7,0):</u> | 10 mM | Pipes |
| | 55 mM | MnCl ₂ |
| | 250 mM | KCl |
| | 15 mM | CaCl ₂ |

Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen (Inoue *et al.*, 1990)

250 ml SOB-Medium (3.9.1) wurden mit 10 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur (3.9.1) beimpft und bei 25 °C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,5$ bis $0,7$) bebrütet. Nach einer 10 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterienzellen sedimentiert (10 min, $3.800 \times g$, 4 °C), in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, $3.800 \times g$, 4 °C) wurde das Sediment vorsichtig in 20 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen. Durch Zugabe von DMSO zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v) konnten die Zellen im Anschluss an weitere 10 min auf Eis in aliquotierter Form in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

Transformation mit Plasmid-DNA (modifiziert nach Hanahan, 1983)

100 ng präparierte Plasmid-DNA (3.10.1) beziehungsweise $\frac{1}{2}$ eines Ligationsansatzes (3.10.9) wurden zu 200 μ l transformationskompetenten *E. coli*-Zellen gegeben und 1 h auf Eis inkubiert. Während des sich anschließenden Hitzeschocks (90 s, 42 °C) erfolgte die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zelle. Der Ansatz wurde erneut 5 min auf Eis inkubiert, anschließend mit 700 μ l LB-Medium (3.9.1) versetzt und für 30 min bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden nach einer Zentrifugation (1 min, $6.100 \times g$, RT) in 200 μ l LB-Medium konzentriert, auf ampicillinhaltigem LB-Agar (3.9.1) ausplattiert und bebrütet. Gleichbehandelte Ansätze, denen keine DNA zugesetzt wurde, dienten hierbei als Negativkontrolle.

3.10.11 DNA-Sequenzierung

Mit Ausnahme von Promotorbereichen wurden sämtliche PCR-Produkte (3.10.3) nach ihrer Klonierung vollständig sequenziert, um unerwünschte Mutationen auszuschließen. Die Sequenzierungsarbeiten wurden von der Firma Seqlab, Göttingen durchgeführt, als Startermoleküle dienten synthetisierte Oligonukleotide (3.5).

3.10.12 Konstruktion der verwendeten Plasmide

Die Konstruktion der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide (3.4) erfolgte in folgenden Einzelschritten:

Klonierung von PCR-Produkten

Nach einer Polymerasekettenreaktion (3.10.3) wurde das amplifizierte DNA-Fragment säulenchromatographisch gereinigt (3.10.4) und in eine Restriktionsreaktion (3.10.5) eingesetzt. Auch das für die Klonierung vorgesehene Plasmid wurde entsprechend hydrolysiert. Im Anschluss wurden sowohl das PCR-Produkt als auch der Vektor-Anteil des Plasmids über ein präparatives Agarosegel (3.10.7) gereinigt, eluiert (3.10.8) und daraufhin wie unter 3.10.9 beschrieben ligiert.

***in vitro*-Rekombination von Plasmid-DNA**

Beide Plasmide wurden hydrolysiert, die interessierenden Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese und Elution isoliert und in eine Ligationsreaktion eingesetzt.

- pHK385:** PCR mit HK115/HK116, Matrize: chromosomale DNA von *S. cerevisiae* HKY36, kloniert über *EcoRI/XbaI* in pHK367;
=> Austausch von P_{GBP2} gegen P_{GALI}
- pHK389:** PCR mit HK123/HK52, Matrize: chromosomale DNA von *S. cerevisiae* HKY36, kloniert über *EcoRI/XhoI* in pHK367;
Sequenzierung mit HK48, HK81, HK91, HK123, HK128;
=> Austausch von *GBP2* gegen *gbp2(Δ4-297)*
- pHK404:** PCR mit HK124/HK125, Matrize: chromosomale DNA von *S. cerevisiae* HKY36, kloniert über *BamHI* in pHK50, Selektion positiver Klone auf α⁻-Komplementations-Platten (3.9.1);
Sequenzierung mit HK50, HK91, HK92, HK93
=> Insertion von P_{GBP2}:*GBP2*
- pHK407:** *BamHI*-Fragment aus pHK404 kloniert in 5'-dephosphorylierten (3.10.6) pHK110
=> Insertion von P_{GBP2}:*GBP2*
- pHK408:** PCR mit HK157/HK158, Matrize: chromosomale DNA von *S. cerevisiae* HKY36, kloniert über *EcoRI/PstI* in pHK235;
=> Austausch von P_{GALI} gegen P_{HRBI}
- pHK412:** PCR mit HK130/HK131, Matrize: pHK367, kloniert über *EcoRI/ClaI* in pHK367;
Sequenzierung mit HK48, HK128
=> Austausch von *GBP2* gegen *gbp2(S13/I5/I7A)*
- pHK422:** *NotI/KpnI*-Fragment aus pHK385 kloniert in pHK104
=> Insertion von P_{GALI}:*GBP2-GFP*
- pHK431:** PCR mit HK166/HK131, Matrize: pHK367, kloniert über *EcoRI/ClaI* in pHK367;
Sequenzierung mit HK48, HK128
=> Austausch von *GBP2* gegen *gbp2(S15A)*
- pHK432:** PCR mit HK167/HK131, Matrize: pHK367, kloniert über *EcoRI/ClaI* in pHK367;
Sequenzierung mit HK48, HK128
=> Austausch von *GBP2* gegen *gbp2(S17A)*
- pHK446:** PCR mit HK165/HK131, Matrize: pHK367, kloniert über *EcoRI/ClaI* in pHK367;
Sequenzierung mit HK48, HK128
=> Austausch von *GBP2* gegen *gbp2(S13A)*

3.11 Arbeiten mit *S. cerevisiae*

3.11.1 Transformation mit Plasmid-DNA (Gietz *et al.*, 1992)

| | | | |
|---------------------------------------|-----|---------|---------------|
| <u>TE/Lithiumacetat (pH 7,5):</u> | 100 | mM | Lithiumacetat |
| | 10 | mM | Tris/HCl |
| | 1 | mM | EDTA |
| <u>PEG/TE/Lithiumacetat (pH 7,5):</u> | 40 | % (v/v) | PEG 4000 |
| | 100 | mM | Lithiumacetat |
| | 10 | mM | Tris/HCl |
| | 1 | mM | EDTA |

5 ml YPD-Medium (3.9.2) wurden mit einer Einzelkolonie eines Hefestammes beimpft und bei 25 °C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($1-3 \times 10^7$ Zellen/ml) bebrütet. Die Zellen wurden sedimentiert (5 min, $3.800 \times g$, RT) und nacheinander mit 1 ml A. dest. und 1 ml TE/Lithiumacetat gewaschen. Nach Einstellen einer Zelldichte von 1×10^9 Zellen/ml in TE/Lithiumacetat wurden 50 µl dieser Suspension mit 1 µg Plasmid-DNA und 50 µg hitzedenaturierter Heringssperma-Träger-DNA (3.2) vermischt. Nach Zugabe von 300 µl PEG/TE/Lithiumacetat wurde die Probe für 30 min bei 25 °C geschüttelt. In dieser Zeit kam es zu einer Permeabilisierung von Zellwand und Zellmembran, und die derart vorbereiteten Zellen nahmen die Plasmid-DNA während des sich anschließenden Hitzeschocks (15 min, 42 °C) auf. Nach Sedimentation (1 min, $13.700 \times g$, RT) und einmaligem Waschen mit 1 ml A. dest. wurden die Zellen in 100 µl A. dest. resuspendiert, auf entsprechendem Selektivagar (3.9.2) ausplattiert und bebrütet. Gleichbehandelte Ansätze, denen keine DNA zugesetzt wurde, dienten hierbei als Negativkontrolle.

3.11.2 Isolierung von chromosomaler DNA (Rose *et al.*, 1990)

| | | | |
|--|-----|---------|--------------|
| <u>Detergens-Lyse-Puffer (pH 8,0):</u> | 10 | mM | Tris/HCl |
| | 1 | mM | EDTA |
| | 2 | % (v/v) | Triton X-100 |
| | 1 | % (w/v) | SDS |
| | 100 | mM | NaCl |
| <u>TE-Puffer (pH 8,0):</u> | 10 | mM | Tris/HCl |
| | 1 | mM | EDTA |

Hefezellen aus 10 ml einer Übernachtskultur (3.9.2) wurden durch Zentrifugation (5 min, $3.800 \times g$, RT) sedimentiert und der Überstand verworfen. Nach einmaligem Waschen mit 500 μ l A. dest. wurden die Zellen in 50 μ l A. dest. resuspendiert. Es folgte der Aufschluss der Hefezellen durch Zugabe von 200 μ l Detergens-Lyse-Puffer, 200 μ l Phenol-Chloroform-Amylalkohol (25:24:1), 300 μ l Glasperlen (3.2) und 5 min intensivem Schütteln bei 4 °C. Der Ansatz wurde mit 200 μ l TE-Puffer vermischt und die Phasen durch Zentrifugation (5 min, $16.100 \times g$, RT) separiert. Die wässrige, von Proteinresten befreite Oberphase wurde überführt und die chromosomale DNA durch Versetzen mit 6 μ l 7,5 M Ammoniumacetat und 1 ml Ethanol (abs.) als Ammoniumsalz gefällt. Das entstandene Präzipitat wurde sedimentiert (5 min, $16.100 \times g$, RT) und bei RT luftgetrocknet. Im Anschluss wurde die chromosomale DNA in 50 μ l TE-Puffer aufgenommen und bis zum späteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.11.3 Isolierung von Gesamt-RNA

DEPC-behandeltes A. dest.: 0,1 % (v/v) DEPC

Zur chemischen Inaktivierung von Ribonukleasen durch das alkylierend wirkende DEPC (3.2) wurde die Lösung ü.N. bei RT inkubiert und anschließend autoklaviert.

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus Hefezellen erfolgte mittels einer Guanidin-isothiocyanat-Phenol-Methode unter Verwendung von „PeqGold RNA Pure“ (3.2) nach dem Protokoll des Herstellers. Eingesetzt wurden jeweils logarithmisch wachsende Hefezellen aus 50 ml Kultur einer OD_{600} von 0,5 (= 25 OD). Im Anschluss wurde die RNA in 50 μ l DEPC-behandeltem A. dest. gelöst und bis zur späteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Die Konzentration der RNA wurde spektralphotometrisch (3.1) gegen A. dest. als Referenz ermittelt. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 μ g/ml (Sambrook *et al.*, 1989).

3.11.4 Generelle Methoden der Fluoreszenz-Mikroskopie mit Hefe (modifiziert nach Bossie *et al.*, 1992)

| | | |
|---------------------------------|-------|------------|
| <u>Phosphatpuffer (pH 6,5):</u> | 33 mM | K_2HPO_4 |
| | 67 mM | KH_2PO_4 |
| <u>P-Lösung (pH 6,5):</u> | 33 mM | K_2HPO_4 |
| | 67 mM | KH_2PO_4 |
| | 1,2 M | Sorbitol |

| | | | |
|---|------|---------|----------------------------------|
| <u>Eindeckmittel (pH 8,0):</u> | 2 | % (w/v) | N-Propyl-Gallat |
| | 80 | % (v/v) | Glycerin |
| | 27,4 | mM | NaCl |
| | 0,5 | mM | KCl |
| | 1,6 | mM | Na ₂ HPO ₄ |
| | 0,4 | mM | KH ₂ PO ₄ |
| <u>Antikörper-Waschpuffer 2 (pH 9,5):</u> | 0,1 | M | Tris/HCl |
| | 0,1 | M | NaCl |

Chemische Fixierung der Zellen

5 ml einer logarithmisch wachsenden Hefekultur ($1-3 \times 10^7$ Zellen/ml) wurden mit 350 µl 37 % (v/v) Formaldehyd vermischt. Waren die Zellen für eine indirekte Immunfluoreszenz (3.13.2) oder Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (3.14.1) vorgesehen, so erfolgte die Fixierung für 30 bis 60 min bei der vorangegangenen Wachstumstemperatur. Die Inkubation entfiel hingegen, wenn die Lokalisierung eines GFP („green fluorescent protein“) -fusionierten Proteins analysiert werden sollte (3.13.1). Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, $3.800 \times g$, RT) sedimentiert und der Überstand verworfen. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml Phosphatpuffer und einmaligem Waschen mit 1 ml P-Lösung wurde das Zellsediment in 100 µl P-Lösung resuspendiert. Derart fixierte Zellen konnten vor ihrer weiteren Verwendung mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden.

Enzymatischer Verdau der Zellwand

100 µl in P-Lösung aufgenommener, fixierter Hefezellen wurden mit 1 µl 1 M DTT versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 U Zymolase (3.6) begann der enzymatische Verdau der Zellwand, dessen Fortschreiten permanent phasenkontrast-mikroskopisch verfolgt wurde. Sobald die Hälfte der Zellen dunkel erschien erfolgte eine Abtrennung der Zymolase durch Zentrifugation (1 min, $13.700 \times g$, RT) und zwei Waschschrte mit je 1 ml P-Lösung. Schließlich wurden die Sphäroplasten vorsichtig in 100 µl P-Lösung resuspendiert.

Beladen und Eindecken der Objektträger

Die Teflon-Beschichtung der verwendeten Objektträger (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen) wies kreisförmige Aussparungen auf, die zunächst für 5 min mit 0,3 % (w/v) Polylysin (3.2) bedeckt, dann mit A. dest. gespült und luftgetrocknet wurden. Hierdurch bildete sich eine polykationische Matrix, die im folgenden eine Adhäsion der negativ geladenen Zelloberflächen bewirkte. 25 µl einer auf eine adäquate Dichte eingestellten

Zellsuspension in P-Lösung wurden pro Aussparung aufgetropft und zur Sedimentation der Zellen für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend konnte der Überstand entfernt und die Proben dem jeweiligen Protokoll entsprechend mit je 25 µl weiterer Lösungen behandelt werden.

Zum Eindecken wurde der Objektträger bei RT luftgetrocknet, mit Eindeckmittel beschichtet und mit einem Deckglas versehen.

Permeabilisierung der Zellmembran

Um DNA-Sonden (3.14.1), Antikörpern (3.6) oder dem Fluorochrom DAPI (3.2) eine Passage der Zellmembran zu ermöglichen, wurde diese durch 5 min Behandlung der fixierten Zellen mit frisch angesetzttem 0,5 % (v/v) Triton X-100 in P-Lösung bei RT permeabilisiert.

DNA-Färbung mit DAPI

Zur spezifischen *in situ*-Färbung von DNA wurden Zellen mit permeabilisierter Zellmembran für 5 min mit 30 µM DAPI in Antikörper-Waschpuffer 2 bei RT behandelt und überschüssiger Farbstoff anschließend durch 3 × 5 min Inkubation mit Antikörper-Waschpuffer 2 entfernt.

Fluoreszenz-Mikroskopie

Die mikroskopische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Leitz Aristoplan Fluoreszenz-Mikroskops (3.1) mit den Filtereinheiten I3 für GFP und FITC, N2.1 für Cyanin 3 und TRSC und A für DAPI. Zur digitalen Bildaufnahme und -verarbeitung war diesem die Kamera Orca C4742-95 mit dazugehörigem Computerprogramm HPD-CP Version 2.6.2.0 angeschlossen.

3.11.5 Sporulation und Tetradenanalyse (Rose *et al.*, 1990)

Im Vorfeld einer Tetradenanalyse wurden zwei haploide Hefestämme unterschiedlichen Kreuzungstyps auf YPD-Nährboden (3.9.2) vermischt und ü.N. bei 25 °C bebrütet. Die derart erzeugten diploiden Zellen wurden zur Induktion der Sporulation in 2 ml Super-SPO-Medium (3.9.2) angeimpft und für 2 bis 3 Tage bei 25 °C auf einem Brutroller (3.1) inkubiert. Das Ausmaß der Ascibildung konnte mikroskopisch verfolgt werden.

Zur Separierung der Sporen wurden Zellen aus 50 µl Kultur durch Zentrifugation (1 min, 13.700 × g, RT) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 50 µl P-Lösung (3.11.4) resuspendiert, mit 0,5 U Zymolase (3.6) versetzt und bis zur enzymatischen Lyse der Ascuswand und dem Austreten der Sporen ca. 45 min bei RT

inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (1 min, $13.700 \times g$, RT) wurden die Zellen in 200 μ l P-Lösung aufgenommen und durch Zugabe von 1,8 ml A. dest. verdünnt. 50 μ l der somit auf eine adäquate Zelldichte eingestellten Suspension wurden in Form einer geraden Linie auf YPD-Agar aufgetragen. Mit Hilfe einer Glasnadel, die über einen am Mikroskop (3.1) befestigten Mikromanipulator bewegt wurde, konnten die Sporen einer Tetrade getrennt und innerhalb eines Koordinatensystems geordnet auf dem Agar abgelegt werden. Nach 2 bis 4 Tagen Inkubation der Agarplatte bei 25 °C wurde der Phänotyp der gekeimten Sporen auf Selektivmedium (3.9.2) analysiert.

3.11.6 Konstruktion der Stämme HKY351 und HKY352

Zur Herstellung isogener *npl3-27*- und Wildtyp-Zellen wurden die *S. cerevisiae*-Stämme HKY29 (*npl3-27*) und HKY36 (WT) (3.3.2) wie unter 3.11.5 beschrieben gekreuzt und sporuliert, die Sporen mehrerer Tetraden separiert und ihr Phänotyp analysiert. Die Verteilung des *npl3-27*-Gens konnte in einer indirekten Immunfluoreszenz (3.13.2) mit Anti-Npl3p-Antikörpern (3.6) ermittelt werden, da *npl3-27p* im Gegensatz zu Npl3p nach 30 min Inkubation bei 37 °C im Zytoplasma akkumuliert (Krebber *et al.*, 1999). Eine *npl3-27*-Spore wurde daraufhin mit HKY36 rückgekreuzt. HKY351 (*npl3-27*) und HKY352 (WT) sind aus zwei Sporen der selben Tetrade dieser zweiten Kreuzung hervorgegangen.

3.11.7 Aufschluss von Hefezellen in SDS-Probenpuffer (modifiziert nach Horvath und Riezman, 1994)

Um Hefezellen für eine Proteinanalyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.12.3) und Immunoblot (3.13.3) aufzuschließen, wurden 10 ml Medium (3.9.2) mit einer Einzelkolonie beimpft. Die Kultur wurde bei 25 °C bis zu einer Dichte von $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml oder einer OD₆₀₀ von 0,6 bebrütet, bevor die Zellen ($2,5 \times 10^8$ Zellen oder 6 OD) durch Zentrifugation (5 min, $3.800 \times g$, RT) sedimentiert und mit 1 ml A. dest. gewaschen wurden. Nach vollständiger Entfernung des Überstandes und der Zugabe von 50 μ l Glasperlen (3.2), 200 μ l 1 \times SDS-Probenpuffer (3.12.3) und 7,5 μ l „Protease Inhibitor Cocktail“ (3.2) erfolgte die Lyse durch intensives Schütteln für 5 min bei 4 °C. Der proteinhaltige Überstand wurde durch Zentrifugation (5 min, $16.100 \times g$, 4 °C) von Zelltrümmern separiert, überführt und bis zur späteren Analyse bei -80 °C gelagert.

3.11.8 Isolierung mRNA-bindender Proteine mittels UV-Quervernetzung *in vivo* (Krebber *et al.*, 1999)

| | | | |
|---|------|---------|--|
| <u>PBS (pH 7,4):</u> | 137 | mM | NaCl |
| | 2,7 | mM | KCl |
| | 8,1 | mM | Na ₂ HPO ₄ |
| | 1,8 | mM | KH ₂ PO ₄ |
| <u>Lysepuffer (pH 7,5):</u> | 20 | mM | Tris/HCl |
| | 50 | mM | LiCl |
| | 1 | % (w/v) | SDS |
| | 1 | % (v/v) | β-Mercaptoethanol |
| | 0,1 | % (w/v) | Heparin |
| | 10 | mM | „Ribonucleoside-Vanadyl Complex“ |
| | 1 | mM | EDTA |
| | 1 | × | Proteaseinhibitor-Mischung „Complete Mini, EDTA-free“ |
| <u>Oligo(dT)-Bindepuffer (pH 7,4):</u> | 10 | mM | Tris/HCl |
| | 500 | mM | LiCl |
| | 0,5 | % (w/v) | SDS |
| | 1 | mM | EDTA |
| <u>Elutionspuffer (pH 7,4):</u> | 10 | mM | Tris/HCl |
| | 0,05 | % (w/v) | SDS |
| | 1 | mM | EDTA |
| <u>Resuspendierungspuffer (pH 7,4):</u> | 10 | mM | Tris/HCl |
| | 100 | mM | NaCl |
| | 2,5 | mM | MgCl ₂ |
| | 1 | mM | CaCl ₂ |

Lysepuffer, Oligo(dT)-Bindepuffer und Elutionspuffer wurden mit DEPC-behandeltem A. dest. (3.11.3) angesetzt.

500 ml Medium wurden mit einer Übernachtskultur (3.9.2) beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 25 °C bebrütet. Die logarithmisch wachsenden Hefezellen (= 500 OD) wurden durch Zentrifugation (15 min, 4.500 × g, 4 °C) geerntet, mit 50 ml eiskaltem PBS gewaschen und in 50 ml PBS aufgenommen. Die Suspension wurde in eine Petrischale

überführt, die sich in einem Eisbad befand und einen Durchmesser von 15 cm aufwies. Während einer $2 \times 2,5$ min Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm im „UV Stratalinker 2400“ (3.1) fand eine kovalente Vernetzung der mRNA-Moleküle mit ihren Bindeproteinen statt. Die Distanz zwischen Petrischale und Energiequelle betrug hierbei 10 cm. Die Zellen wurden sedimentiert (5 min, $3.800 \times g$, 4°C), in 2 ml PBS resuspendiert und auf drei Reaktionsgefäße verteilt. Nach erneuter Zentrifugation (1 min, $13.700 \times g$, 4°C) wurde der Überstand verworfen, und es erfolgte die Zugabe von jeweils 500 μl Glasperlen (3.2), 1 ml Lysepuffer, 5 μl „Protease Inhibitor Cocktail“ (3.2) und 10 μl „RNasin Ribonuclease Inhibitor“ (3.2). Zum Aufschluss der Hefezellen wurden die Ansätze 15 min intensiv bei 4°C geschüttelt. Die Überstände konnten durch Zentrifugation (15 min, $16.100 \times g$, 4°C) von den Zelltrümmern separiert und nachfolgend vereint werden.

Zwischenzeitlich wurden 0,2 g Oligo(dT)-Zellulose (3.2) für 1 h bei RT in 10 ml Elutionspuffer geschwenkt, sedimentiert (2 min, $100 \times g$, RT), zweifach mit 10 ml Oligo(dT)-Bindepuffer gewaschen und schließlich in 10 ml dieses Puffers resuspendiert.

Die derart hydratisierte und äquilibrierte Zellulose wurde zusammen mit 236 μl 10 M LiCl und 10 μl „RNasin Ribonuclease Inhibitor“ dem Zellextrakt zugesetzt. Während einer 30 min Inkubation bei RT unter leichtem Schütteln erfolgte die Bindung der 3'-polyadenylierten mRNA-Moleküle an die Oligo(dT)-Matrix. Zur Entfernung ungebundener Moleküle wurde die Zellulose zweifach mit 5 ml Oligo(dT)-Bindepuffer gewaschen, in 3 ml des Puffers resuspendiert und auf eine leere Chromatographie-Säule (Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA) gegeben. Zur Erhöhung der Bindungsspezifität wurde die mRNA durch Zugabe von 3 ml Elutionspuffer eluiert, für 10 min auf 65°C erhitzt, um doppelsträngige Sequenzen aufzubrechen, und anschließend für 10 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 150 μl 10 M LiCl wurde der Ansatz erneut auf die zwischenzeitlich mit 5 ml Oligo(dT)-Bindepuffer gewaschene Oligo(dT)-Zellulose-Säule geladen. Nach langsamem Durchtropfen der Probe konnte die Zellulose durch Zugabe von 10 ml Oligo(dT)-Bindepuffer gewaschen und die so gereinigte mRNA nachfolgend mit 3 ml Elutionspuffer eluiert werden.

Das mRNA- und proteinhaltige Eluat wurde zur Volumenverringerung mit 2 Volumen sec-Butanol versetzt und gut durchmischt. Durch Zentrifugation (2 min, $16.100 \times g$, RT) wurden die zwei Phasen separiert und die obere Phase im Anschluss verworfen. Diese Behandlung erfolgte so häufig bis die Probe ein Volumen von ca. 300 μl erreicht hatte. Nach Zugabe von 6 μl 10 M LiCl und 900 μl Ethanol (abs.) fiel die RNA während einer ü.N. Inkubation bei -80°C als Lithiumsalz aus. Das entstandene Präzipitat wurde sedimentiert (15 min, $16.100 \times g$, 4°C), in 25 μl Resuspendierungspuffer aufgenommen und zum Schutz vor einer Degradierung der Proteine mit 0,5 μl „Protease Inhibitor

Cocktail“ versetzt. Nach Zugabe von 7 U Ribonuklease A (3.6) und 200 U Nuklease von *Staphylococcus aureus* (3.6) wurden die mRNA-Moleküle in einer 30 min Inkubation bei 30 °C degradiert. Schließlich wurde der Ansatz mit 13 µl 3 × SDS-Probenpuffer (3.12.3) vermischt und mittels SDS-Gelelektrophorese (3.12.3) und Immunoblot (3.13.3) analysiert. Gleichbehandelte Ansätze ohne UV-Bestrahlung dienten als Negativkontrollen.

3.11.9 Separierung von Polysomen mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation (modifiziert nach Frey *et al.*, 2001)

| | | |
|-----------------------------|--------|---|
| <u>Lysepuffer (pH 7,6):</u> | 20 mM | Hepes/KOH |
| | 100 mM | Kaliumacetat |
| | 5 mM | Magnesiumacetat |
| | 1 mM | EDTA |
| | 1 mM | DTT |
| | 355 µM | Cycloheximid |
| | 0,1 mM | PMSF |
| | 2 × | Proteaseinhibitor-Mischung „Complete, EDTA-free“ |

Um zu überprüfen, ob bestimmte Proteine mit aktiven Translationskomplexen kosedimentieren, wurden zunächst 50 ml Medium (3.9.2) mit einer Einzelkolonie eines Hefestammes beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 25 °C bebrütet. Die logarithmisch wachsende Kultur wurde mit Cycloheximid zu einer Endkonzentration von 355 µM versetzt und weitere 15 min bei 25 °C inkubiert. Dies bewirkte eine Inhibierung der ribosomalen Peptidyltransferase-Aktivität und hierdurch eine Arretierung translatierender Ribosomen auf den mRNA-Molekülen. Die Zellen (= 25 OD) wurden durch Zentrifugation (5 min, 3.800 × g, RT) geerntet und in 323 µl Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl „Protease Inhibitor Cocktail“ (3.2) und 300 µl Glasperlen (3.2) erfolgte der Zellaufschluss durch 5 min intensives Schütteln bei 4 °C. Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation (2 min, 1.200 × g, 4 °C), Überführung des Überstandes und erneute Zentrifugation (20 min, 6.000 × g, 4 °C) sedimentiert.

100 µl des Extrakts wurden auf einen linearen 12 ml 15-50 % (w/v) Saccharose-Dichtegradienten in Lysepuffer, der kein „Complete, EDTA-free“ enthielt, aufgetragen. Durch Ultrazentrifugation (1,5 h, 280.000 × g, 4 °C) erfolgte eine Trennung der ribosomalen Untereinheiten von den schneller in den Gradienten einlaufenden Mono- und Polysomen. Anschließend konnten die Gradienten mit Hilfe eines Fraktionierers (3.1) in 600 µl-Schritten zerlegt werden. Während der Fraktionierung wurde von einem Durchflussphotometer kontinuierlich die OD₂₅₄ aufgezeichnet, die Aufschluss über die Verteilung der

rRNA-Moleküle im Gradienten gab. Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden durch Fällung (3.12.1) konzentriert, in $1 \times$ SDS-Probenpuffer (3.12.3) aufgenommen und mittels SDS-Gelelektrophorese (3.12.3) und Immunoblot (3.13.3) analysiert.

Um zu überprüfen, ob von der Kosedimentation auf eine spezifische Assoziation des Proteins mit den aktiven Translationskomplexen geschlossen werden kann, wurden Kontrollexperimente mit folgenden Modifikationen vorgenommen:

Die Zugabe von Cycloheximid zur Kultur oder zum Lysepuffer unterblieb. Stattdessen wurde der Zellextrakt mit Puromycin und GTP zu einer Endkonzentration von je 1 mM versetzt und vor dem Beladen des Gradienten für 15 min bei 22 °C (bei Gbp2p und Npl3p) bzw. 22 min bei 30 °C (bei Dbp5p) inkubiert. Der Einsatz von Puromycin führte zu einer selektiven Zerstörung der Polysomen, da das Antibiotikum als Aminoacyl-tRNA-Analogon agiert. Die wachsende Peptidkette wird in Gegenwart von GTP hierauf übertragen, woraufhin es zu einem vorzeitigen Kettenabbruch und einer Dissoziation der Ribosomen von den mRNA-Molekülen kommt (Blobel und Sabatini, 1971).

Ein ansonsten identischer Ansatz, dem A. dest. anstelle von Puromycin und GTP zugesetzt wurde, diente als Vergleich.

3.12 Proteinbiochemische Methoden

3.12.1 Fällung von Proteinen (Bensadoun und Weinstein, 1976)

Zur Konzentrierung von Proteinen für eine anschließende Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese (3.12.3) wurden die Proben mit 1 Volumen 20 % (v/v) Trichloressigsäure versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation (15 min, $16.100 \times g$, RT) sedimentiert, mehrmals mit 80 % (v/v) Aceton gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge (3.1) getrocknet und in $1 \times$ SDS-Probenpuffer (3.12.3) aufgenommen.

3.12.2 Photometrische Quantifizierung von Proteinen

Die photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte unter Verwendung des „RC DC Protein Assay“-Systems (3.7) nach dem Protokoll des Herstellers. Das System ist unempfindlich gegenüber reduzierenden Substanzen und Detergentien und erlaubt somit auch dann eine Quantifizierung, wenn die Proteine in SDS-Probenpuffer (3.12.3) gelöst vorliegen.

3.12.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

| | | |
|---------------------------------|--------------|---|
| <u>Sammelgel (5 %, pH 6,8):</u> | 16,7 % (v/v) | 30 % (w/v) Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % (w/v) Bisacrylamid |
| | 125 mM | Tris/HCl |
| | 0,1 % (w/v) | SDS |
| | 0,1 % (w/v) | APS |
| | 0,1 % (v/v) | TEMED |
| <u>Trenngel (9 %, pH 8,8):</u> | 30 % (v/v) | 30 % (w/v) Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % (w/v) Bisacrylamid |
| | 375 mM | Tris/HCl |
| | 0,1 % (w/v) | SDS |
| | 0,1 % (w/v) | APS |
| | 0,05 % (v/v) | TEMED |

Für Trenngele mit abweichender Acrylamid-Konzentration wurde der Anteil der Acrylamid-Stammlösung entsprechend variiert.

| | | |
|--|--------------|-------------------|
| <u>Elektrophoresepuffer:</u> | 25 mM | Tris |
| | 250 mM | Glycin |
| | 0,02 % (w/v) | SDS |
| <u>SDS-Probenpuffer (1 ×, pH 6,8):</u> | 50 mM | Tris/HCl |
| | 10 % (v/v) | Glycerin |
| | 2,4 % (w/v) | SDS |
| | 5 % (v/v) | β-Mercaptoethanol |
| | 0,02 % (w/v) | Bromphenolblau |

Die Auftrennung proteinhaltiger Proben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem. Die Elektrophorese wurde in vertikalen Gelapparaturen (3.1) bei einer konstanten Spannung von 60 bis 100 V pro Gel durchgeführt, wobei der Elektrophoresepuffer sowohl als Anoden- als auch Kathodenpuffer Verwendung fand. Die in 1 × SDS-Probenpuffer gelösten Proteine wurden durch 5 min Aufkochen bei 95 °C denaturiert und zusammen mit dem Molekulargewichtsstandard „BenchMark Prestained Protein Ladder“ (3.2) auf das Polyacrylamidgel aufgetragen.

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurden die Proteine mittels Coomassie-Färbung (3.12.4) im Trenngel analysiert oder mittels Western-Transfer (3.12.5) auf eine Membran übertragen.

3.12.4 Coomassie-Färbung (Neuhoff *et al.*, 1988)

| | | |
|------------------------|--------------|----------------------------------|
| <u>Färbelösung:</u> | 0,25 % (w/v) | „Coomassie brilliant blue R-250“ |
| | 50 % (v/v) | Methanol |
| | 10 % (v/v) | Essigsäure |
| <u>Entfärbelösung:</u> | 5 % (v/v) | Methanol |
| | 7 % (v/v) | Essigsäure |

Zur gleichzeitigen Fixierung und Färbung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine wurde das SDS-Polyacrylamidgel (3.12.3) für 4 h bei RT in Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde so lange die Entfärbelösung angewendet, bis die Proteinbanden deutlich hervortraten.

3.12.5 Western-Transfer (Kyhse-Andersen, 1984)

| | | |
|---------------------------------|------------|----------|
| <u>Transferpuffer (pH 8,3):</u> | 25 mM | Tris |
| | 190 mM | Glycin |
| | 10 % (v/v) | Methanol |

Der Proteintransfer aus einem SDS-Polyacrylamidgel (3.12.3) auf eine PVDF-Membran („Immobilon-P Transfer Membran“, 3.2) erfolgte in einer „Semi-Dry Blot“-Apparatur (3.1). Die Übertragung fand bei einer Stromstärke von 1,5 mA/cm² Membran für 1,5 h in Transferpuffer statt. Die derart immobilisierten Proteine konnten anschließend in einem Immunoblot-Verfahren (3.13.3) nachgewiesen werden.

3.13 Spezifischer Proteinnachweis

3.13.1 GFP-Mikroskopie

Siehe auch 3.11.4. Zur Analyse der intrazellulären Lokalisierung eines GFP-markierten Proteins wurden chemisch fixierte Hefezellen auf einen Objektträger aufgebracht. Nach einer Permeabilisierung der Zellmembran und je einmaligem Waschen mit P-Lösung und Antikörper-Waschpuffer 2 konnte die DNA mit DAPI gefärbt werden. Anschließend wurden die Proben eingedeckt und im Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet.

3.13.2 Indirekte Immunfluoreszenz (modifiziert nach Bossie *et al.*, 1992)

| | | |
|--|-------------|------------------------|
| <u>Antikörper-Blockierungspuffer (pH 9,0):</u> | 0,1 M | Tris/HCl |
| | 0,15 M | NaCl |
| | 5 % (w/v) | hitzeinaktiviertes FCS |
| | 0,3 % (v/v) | Triton X-100 |
| <u>Antikörper-Waschpuffer 1 (pH 9,0):</u> | 0,1 M | Tris/HCl |
| | 0,15 M | NaCl |

Siehe auch 3.11.4. Die indirekte Immunfluoreszenz diente der *in situ*-Detektion des Proteins Npl3p. Chemisch fixierte Hefezellen wurden nach enzymatischem Verdau der Zellwand auf einen Objektträger aufgebracht. Im Anschluss an eine Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Proben für 1 h bei RT mit Antikörper-Blockierungspuffer behandelt, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Der Erstantikörper (Kaninchen-Anti-Npl3p, 3.6) wurde 1 : 1.000 in Antikörper-Blockierungspuffer verdünnt und für eine Inkubation ü.N. bei 4 °C in einer Feuchtekammer auf die Zellen gegeben. Überschüssige Antikörpermoleküle wurden bei RT durch aufeinanderfolgende Waschschrte für 1 min, 10 min und 30 min mit Antikörper-Waschpuffer 1 sowie für 10 min und 30 min mit Antikörper-Waschpuffer 2 entfernt. Es schloss sich eine 1 h Inkubation bei RT mit 1 : 100 in Antikörper-Blockierungspuffer verdünntem Zweitantikörper (Ziege-Anti-Kaninchen, FITC- oder TRSC-Konjugat, 3.6) an. Die Entfernung ungebundener Antikörpermoleküle erfolgte wie oben beschrieben. Die Proben wurden mit dem DNA-spezifischen Fluorochrom DAPI gefärbt, eingedeckt und im Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet.

3.13.3 Immunoblot

| | | |
|----------------------------|--------------|--------------------------|
| <u>PBST (pH 7,4):</u> | 0,05 % (v/v) | Tween 20 in PBS (3.11.8) |
| <u>Blockierungslösung:</u> | 5 % (w/v) | Milchpulver in PBST |
| <u>Inkubationslösung:</u> | 2 % (w/v) | Milchpulver in PBST |

Die spezifische Detektion elektrophoretisch aufgetrennter (3.12.3) und immobilisierter (3.12.5) Proteine erfolgte in einem indirekten Enzym-Immunoverfahren. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle folgenden Inkubations- und Waschschrte bei RT unter mäßigem Schütteln vorgenommen. Die Membran wurde für 15 min in Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungen von Antikörpern zu unterdrücken. Es folgte eine Behandlung ü.N. bei 4 °C mit einem adäquat in Inkubationslösung verdünnten Erstantikörper (3.6). Nach dreifachem Waschen mit PBST für 10 min wurde der

Erstantikörper durch eine 1 h Inkubation mit einem ebenfalls in Inkubationslösung verdünnten, HRP-konjugierten Zweitantikörper (3.6) markiert. Überschüssige Antikörpermoleküle wurden wie oben beschrieben entfernt und die Membran im Anschluss kurz in PBS (3.11.8) geschwenkt. Der Nachweis des gebundenen Zweitantikörpers erfolgte abhängig von der erwarteten Signalstärke unter Verwendung der Chemilumineszenz-Systeme „ECL“ oder „ECL Plus“ (3.7) nach Herstellerangaben. Die Dokumentation geschah durch 1 bis 60 min andauernde Exposition eines Röntgenfilms („Hyperfilm ECL“, Amersham Biosciences Europe, Buckinghamshire/England).

3.14 Nachweis von mRNA

3.14.1 Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) (modifiziert nach Amberg *et al.*, 1992)

| | | |
|----------------------------------|--------------|-------------------------------------|
| <u>SSC (1 ×, pH 7,4):</u> | 15 mM | Natriumcitrat |
| | 150 mM | NaCl |
| <u>Prähybridisierungslösung:</u> | 50 % (v/v) | deionisiertes Formamid |
| | 60 mM | Natriumcitrat |
| | 600 mM | NaCl |
| | 0,02 % (w/v) | Ficoll |
| | 0,02 % (w/v) | Polyvinylpyrrolidon |
| | 0,02 % (w/v) | BSA |
| | 10 % (w/v) | Dextransulfat |
| | 0,05 % (w/v) | tRNA |
| | 0,05 % (w/v) | hitzedenaturierte Heringssperma-DNA |

Siehe auch 3.11.4. Zur *in situ*-Detektion von Poly(A)⁺-RNA wurden chemisch fixierte Hefezellen nach enzymatischem Verdau der Zellwand auf einen Objektträger aufgebracht. Im Anschluss an eine Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Proben kurz mit P-Lösung gewaschen und für 2 min bei RT in frisch angesetztem 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) äquilibriert. Es folgte eine Blockierung polarer Gruppen durch Behandlung mit 0,25 % (v/v) Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) für 10 min bei RT. Eine Inkubation mit Prähybridisierungslösung für 1 h bei 37 °C diente der Verhinderung unspezifischer Sondenbindungen. Die Sonde (dT₅₀, 5'- und 3'-Ende Cyanin 3-markiert, BioSpring, Frankfurt) wurde auf eine Konzentration von 0,2 µM in Prähybridisierungslösung verdünnt und für eine Inkubation ü.N. bei 37 °C in einer Feuchtekammer auf die Zellen gegeben. Die Entfernung überschüssiger Sondenmoleküle erfolgte durch stringentes

Waschen (1 h $2 \times$ SSC bei RT, 1 h $1 \times$ SSC bei RT, 30 min $0,5 \times$ SSC bei 37°C , 30 min $0,5 \times$ SSC bei RT). Die Proben wurden in Antikörper-Waschpuffer 2 für 5 min bei RT äquilibriert, mit dem DNA-spezifischen Fluorochrom DAPI gefärbt, eingedeckt und im Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet.

3.14.2 Northern-Analyse (modifiziert nach Lei *et al.*, 2001)

| | | |
|---|---------------|--------------------------------------|
| <u>Prähybridisierungspuffer (pH 7,5):</u> | 405 mM | Na_2HPO_4 |
| | 95 mM | NaH_2PO_4 |
| | 7 % (w/v) | SDS |
| | 1 mM | EDTA |
| | 0,005 % (w/v) | hitzenaturierte Heringssperma-DNA |
| <u>Waschpuffer (pH 7,2):</u> | 27,4 mM | Na_2HPO_4 |
| | 12,6 mM | NaH_2PO_4 |
| | 0,1 % (w/v) | SDS |

Sondenmarkierung

Ein dT_{52} -Oligonukleotid (Metabion, Planegg-Martinsried) wurde durch enzymatische Übertragung des γ -Phosphats von ATP auf die 5'-Hydroxylgruppe markiert. 500 ng des Oligonukleotids wurden hierzu mit $200 \mu\text{Ci } \gamma^{32}\text{P-ATP}$ (3.2) und 20 U T4-Polynukleotid-Kinase (3.6) im mitgelieferten Puffer für 45 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von $40 \mu\text{l}$. Es folgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms durch 5 min Erwärmung auf 65°C . Anschließend konnten überschüssige Radionukleotide unter Verwendung des „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ (3.7) abgetrennt werden. Die Vorgehensweise orientierte sich am mitgelieferten Protokoll des Herstellers. Um die Einbaurate zu ermitteln, wurde ein Aliquot der Sonde im Szintillationszähler (3.1) gemessen.

Hybridisierung

Für einen quantitativen Nachweis von Poly(A)^+ -RNA wurden jeweils $5 \mu\text{l}$ extrahierter Gesamt-RNA (3.11.3) auf eine Nylonmembran („Hybond-N“, 3.2) getropft. Eine Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm ($120.000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) im „UV-Stratalinker 2400“ (3.1) führte zu einer kovalenten Bindung der RNA-Moleküle an die Membran. Im Anschluss wurde die Membran für mindestens 4 h bei 55°C in Prähybridisierungspuffer geschwenkt. Dies diente der Äquilibrierung und der Verhinderung unspezifischer Sondenbindungen. Für die Hybridisierung ü.N. bei 55°C wurde die Sonde

auf 8×10^5 Zerfälle $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ in Prähybridisierungspuffer verdünnt. Durch einmaliges Waschen mit Waschpuffer bei RT und zwei stringente Waschschrte für je 10 min bei 55 °C wurden überschüssige Sondenmoleküle entfernt. Die Dokumentation geschah durch mehrstündige Exposition eines Röntgenfilms („Hyperfilm ECL“, Amersham Biosciences Europe, Buckinghamshire/England) bei -80 °C.

3.14.3 Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR)

Für einen semi-quantitativen Nachweis spezifischer mRNAs wurde das auf reverser Transkription mit anschließender PCR-Amplifizierung basierende „OneStep RT-PCR Kit“ (3.7) nach Angaben des Herstellers verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden 100 ng isolierter Gesamt-RNA (3.11.3) eingesetzt, synthetisierte Oligonukleotide (3.5) dienten als Startermoleküle. Die Reaktionen erfolgten in dem PCR-Gerät „Peltier Thermal Cycler PTC-200“ (3.1), und es wurden jeweils 40 PCR-Zyklen mit einer Hybridisierungstemperatur von 50 °C durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Gbp2p und Hrb1p besitzen Merkmale von RNA-Bindeproteinen

Wie ein Homologievergleich (3.8) zeigt, sind Gbp2p und Hrb1p untereinander zu 47 % und mit Npl3p zu 27 % bzw. 23 % identisch. Beide Proteine besitzen drei putative RRMs sowie eine RS/RGG-reiche aminoternale Domäne (Birney *et al.*, 1992; Konkel *et al.*, 1995; Senger *et al.*, 1998; Siebel *et al.*, 1999), welche dem Carboxyterminus von Npl3p ähnelt (Abb. 5). Bei Gbp2p sind hier 10 von insgesamt 12 SR/RS-Dipeptiden und 4 RGG-Motive konzentriert, bei Hrb1p sind es 10 von 11 SR/RS-Dipeptiden und 2 RGG-Motive. Diese stehen einer Anzahl von 8 SR/RS-Dipeptiden und 15 RGG-Motiven bei Npl3p gegenüber.

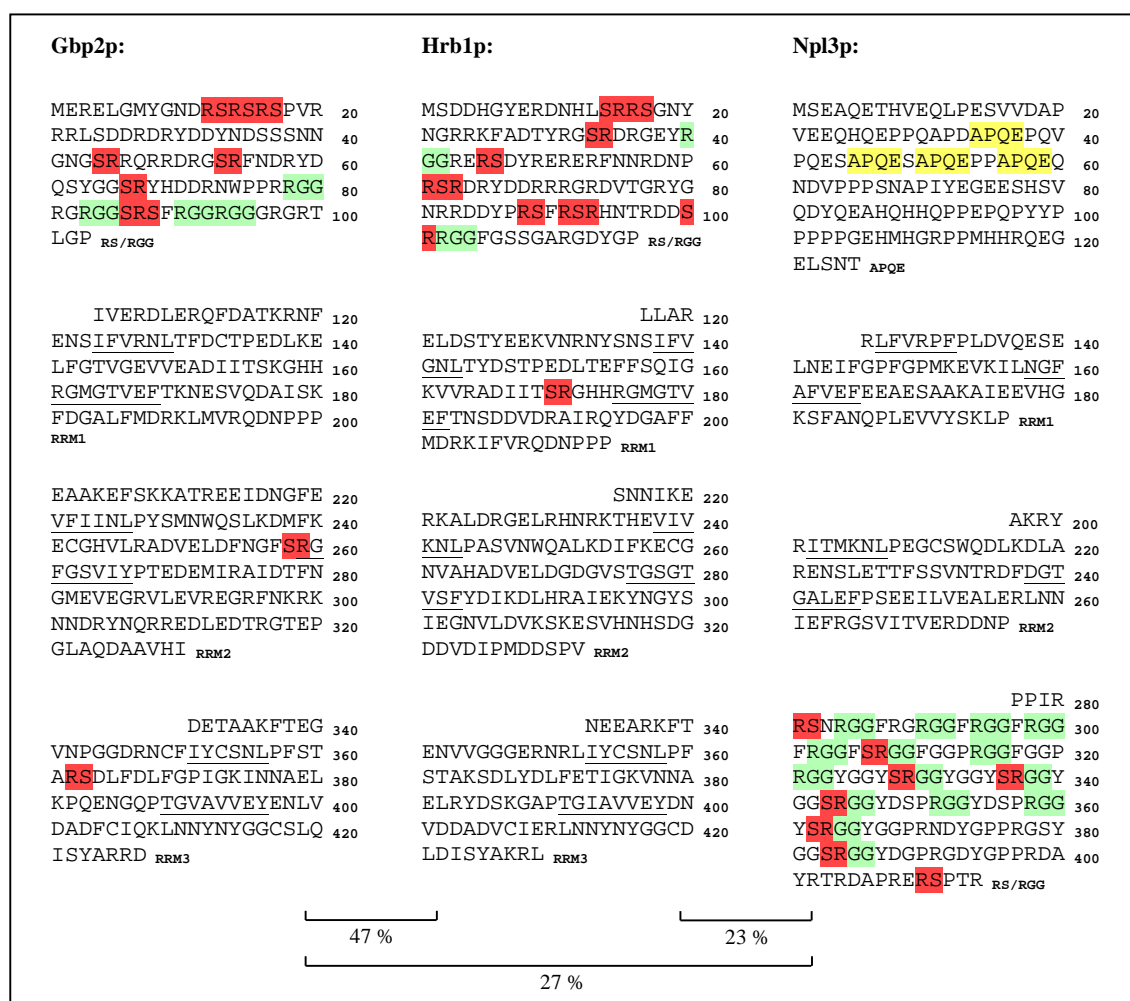


Abb. 5. Vergleich der Domänen-Organisation von Gbp2p, Hrb1p und Npl3p. Gbp2p und Hrb1p weisen beide eine aminoternale Domäne mit mehreren SR/RS- und RGG-Sequenzen sowie drei putative RNA-Erkennungsmotive (RRMs) auf. Die Proteine sind zu 47 % identisch. Npl3p besitzt zwei RRM, eine carboxyterminale, RS/RGG-ähnliche Domäne und vier APQE-Wiederholungen am Aminoternus. Gbp2p und Npl3p sind zu 27 %, Hrb1p und Npl3p zu 23 % homolog. Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen der Proteine. Die SR/RS-, RGG- und APQE-Sequenzen wurden farbig unterlegt. Die konservierten RNP-Submotive innerhalb der RRM sind unterstrichen.

4.2 Mtr10p und Sky1p beeinflussen die intrazelluläre Lokalisierung von Gbp2p und Hrb1p

Um die intrazelluläre Lokalisierung von Gbp2p und Hrb1p zu bestimmen, wurden GFP-markierte Versionen der Proteine in einem logarithmisch wachsenden Wildtyp-Stamm (HKY36; 3.3.2) exprimiert. Die verwendeten Plasmide pHK367 und pHK537 (3.4) gewährleisteten hierbei eine originalgetreue Expressionsrate der Fusionsproteine. Zum einen liegen sie aufgrund des Besitzes einer Zentromersequenz (*CEN*) in lediglich ein- bis zweifacher Kopienzahl pro Zelle vor (Clarke und Carbon, 1980), zum anderen stehen beide Gene unter der Kontrolle des eigenen Promotors. Wie Fluoreszenz-mikroskopische Analysen (3.13.1) zeigten, sind Gbp2p und Hrb1p unter den beschriebenen Bedingungen vorrangig nukleär (Abb. 6A).

Die Stabilität der Fusionsproteine wurde durch einen Immunoblot überprüft. Hierzu wurden die oben erwähnten Hefezellen in SDS-Probenpuffer aufgeschlossen (3.11.7). Anschließend erfolgten eine Auftrennung der Lysate mittels denaturierender SDS-PAGE (3.12.3), ein Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (3.12.5) und ein spezifischer Nachweis mit einem Kaninchen-Anti-GFP-Antikörper (3.6; 3.13.3). In beiden Fällen konnte eine einzige Bande auf der erwarteten Höhe von ca. 76 kDa (49 kDa Gbp2p/Hrb1p + 27 kDa GFP) detektiert werden (Abb. 6B).

Beide GFP-Fusionsproteine sind funktionell, da sie den Wachstumsdefekt einer *GBP2-HRBI*-Doppeldeletionsmutante in Gegenwart von 200 mM Lithiumchlorid vollständig komplementieren (T. Groß, A. Kurz und H. Krebber, Marburg, persönliche Mitteilung).

Zur Identifizierung der Importrezeptoren von Gbp2p und Hrb1p wurden verschiedene Karyopherin-Mutanten mit den Plasmiden pHK367 und pHK537 transformiert (3.11.1). Die Stämme wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase bei 25 °C bebrütet (3.9.2) und anschließend 30 min lang bei der für die thermosensitiven Mutanten nicht-permissiven Temperatur von 37 °C inkubiert. Sowohl Gbp2p als auch Hrb1p waren im Wildtyp und in den Mutanten *kap104-16* (HKY295) (Abb. 6C) und *kap104::HIS3* (HKY86 nach FOA zur negativen Selektion des *URA*-Plasmids (3.9.2)) (ohne Abb.) vorwiegend nukleär. Gbp2p wurde darüber hinaus in den Mutanten *pse1-1* (HKY138) und *kap123::HIS3* (HKY133) getestet, die Lokalisierung war auch hier unverändert (ohne Abb.). In den Stämmen *mtr10::HIS3* (HKY97 nach FOA) (Abb. 6C) und *mtr10-1* (HKY46) (ohne Abb.) akkumulierten Gbp2p und Hrb1p hingegen im Zytoplasma. Die Misslokalisierung erwies sich als spezifisch, da ein NLS-GFP-GFP-Kontrollprotein (pHK513), welches über Kap95p und somit Mtr10p-unabhängig importiert wird (Enenkel *et al.*, 1995), im Zellkern der *mtr10::HIS3*-Zellen zu detektieren war (Abb. 6C). Diese Daten deuten darauf hin, dass es sich bei Mtr10p um den Importrezeptor für Gbp2p und Hrb1p handelt.

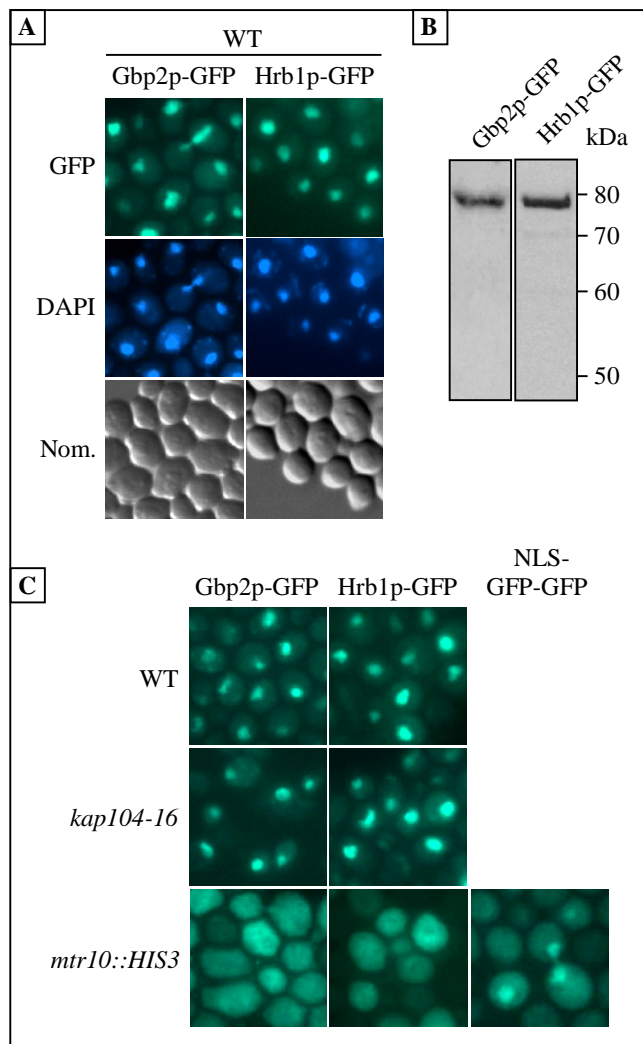


Abb. 6. Gbp2p und Hrb1p werden durch das Karyopherin Mtr10p in den Zellkern importiert. **A:** Gbp2p und Hrb1p sind vorrangig nukleäre Proteine. Gezeigt ist die intrazelluläre Lokalisierung von Gbp2p-GFP und Hrb1p-GFP in einem Wildtyp-Stamm (WT) bei 25 °C. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt, die Zellen wurden mit Nomarski-Optik (Nom.) fotografiert. **B:** Die Fusionsproteine Gbp2p-GFP und Hrb1p-GFP sind stabil. Ganzzelextrakte von je 5×10^7 Zellen eines Gbp2p-GFP- bzw. Hrb1p-GFP-exprimierenden und bei 25 °C angezogenen Wildtyp-Stammes wurden auf ein 9 %iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Membran erfolgte der immunologische Nachweis mit einem Kaninchen-Anti-GFP-Antikörper. Dargestellt ist das entwickelte Chemoluminogramm. **C:** Gbp2p und Hrb1p akkumulieren im Zytoplasma von *mtr10::HIS3*-Zellen. Mittels Fluoreszenz-Mikroskopie wurde die intrazelluläre Lokalisierung von Gbp2p-GFP und Hrb1p-GFP in einem Wildtyp-Stamm, einer *kap104-16*- und einer *mtr10::HIS3*-Mutante nach 30 min Inkubation bei 37 °C analysiert. Als Kontrolle ist die Lokalisierung eines NLS-GFP-GFP-Fusionsproteins in der *mtr10::HIS3*-Mutante unter denselben Bedingungen abgebildet.

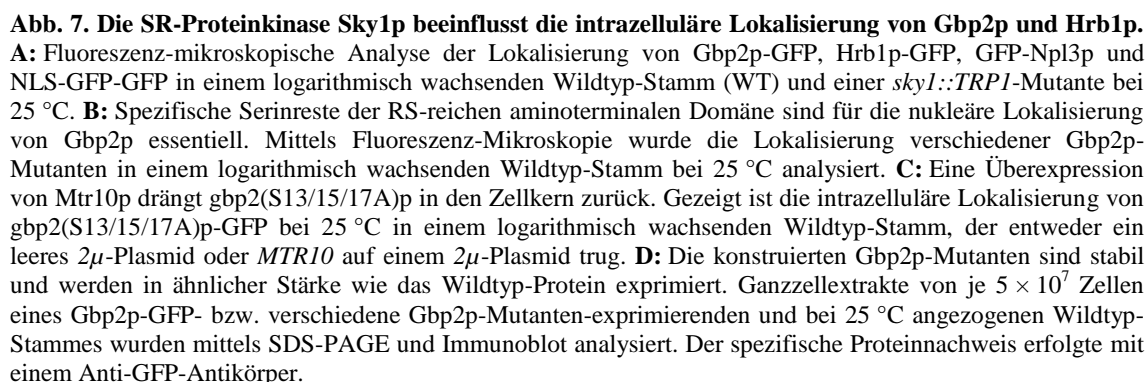
Aufgrund des Besitzes mehrerer SR/RS-Dipeptide (vgl. Abb. 5) sind Gbp2p und Hrb1p potentielle Substrate der SR-Proteinkinase Sky1p. SR-Proteinkinasen regulieren in zahlreichen Fällen die intrazelluläre Lokalisierung ihrer Substrate (Cáceres *et al.*, 1998; Gilbert *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2001). Um zu überprüfen, ob und inwieweit Sky1p die intrazelluläre Lokalisierung von Gbp2p und Hrb1p beeinflusst, wurden beide Proteine als GFP-markierte Versionen (pHK367, pHK537) in einer *sky1::TRP1*-Mutante (HKY267) und einem isogenen Wildtyp-Stamm (HKY268) exprimiert. Die Zellen wurden bei 25 °C bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und anschließend im Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet. Wie in Abb. 7A gezeigt, führte die Deletion von Sky1p zu einer starken Misslokalisierung von Gbp2p und zu einer weniger starken, aber dennoch deutlichen Misslokalisierung von Hrb1p. Das Verhalten von Hrb1p ähnelte dem von Npl3p (pHK418), welches in dem Wildtyp-Stamm ebenfalls vorrangig nukleär lokalisiert war und in der *sky1::TRP1*-Mutante schwach im Zytoplasma akkumulierte (Yun und Fu, 2000; Gilbert *et al.*, 2001).

Die nukleäre Lokalisierung eines NLS-GFP-GFP-Kontrollproteins (pHK513) hingegen änderte sich in der *sky1::TRP1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp nicht (Abb. 7A).

Die SR/RS-Dipeptide sind in der aminoterminalen Domäne von Gbp2p und Hrb1p konzentriert (vgl. Abb. 5). Dementsprechend wurde überprüft, ob die aminoterminal Domäne für die nukleäre Lokalisierung von Gbp2p essentiell ist. Zu diesem Zweck wurden die Nukleotide 4 bis 297 des *GBP2*-Gens entfernt, dies entspricht den Aminosäuren 2 bis 99 und somit der RS-reichen Domäne von Gbp2p (vgl. Abb. 5). Die verkürzte Gbp2p-Version (pHK389) war bei Expression in einem Wildtyp-Stamm (HKY36) zytoplasmatisch (Abb. 7B).

Wie Siebel *et al.* (1999) zeigten, handelt es sich bei Sky1p um ein SRPK-homologes Enzym, dessen Substratspektrum demjenigen der SRPK-Kinasen aus Mammaliazellen entspricht. Um spezifische Serinreste von Gbp2p als Sky1p-Substrate zu identifizieren, wurde daher auf die Ergebnisse eines mit der humanen SR-Proteinkinase SRPK2 durchgeführten *in vitro*-Peptid-Selektions-Experiments zurückgegriffen. SRPK2 bevorzugt demnach Serinreste, die von Arginin- (R), Histidin- (H), Glutaminsäure- (E) oder Prolinresten (P) umgeben sind. Serinreste in der Umgebung von Lysin- (K), Phenylalanin- (F) oder Glycinresten (G) werden gemieden (Wang *et al.*, 1998). Wendet man die Regeln auf Gbp2p an, so zeichnen sich einzig die in der aminoterminalen Domäne lokalisierten Serinreste 13, 15 und 17 als ideale SRPK-Substrate ab (vgl. Abb. 5). Zur experimentellen Überprüfung dieser Hypothese wurden die Serinreste 13, 15 und 17 durch gerichtete Punktmutationen zunächst zusammen (*gbp2*(S13/15/17A)p) und später auch einzeln (*gbp2*(S13A)p, *gbp2*(S15A)p, *gbp2*(S17A)p) gegen Alaninreste (A) ausgetauscht, um eine Phosphorylierung durch Sky1p zu unterbinden. *gbp2*(S13/15/17A)p (pHK412), *gbp2*(S15A)p (pHK431) und *gbp2*(S17A)p (pHK432) waren bei Expression in einem Wildtyp-Stamm (HKY36) komplett zytoplasmatisch (Abb. 7B und C). *gbp2*(S13A)p (pHK446) verhielt sich hingegen wie das Wildtyp-Protein und war in dem Wildtyp-Stamm vorrangig nukleär (Abb. 7B) und in einer *sky1::TRP1*-Mutante (HKY267) vorrangig zytoplasmatisch (ohne Abb.). Die unterschiedlichen Lokalisierungen der Gbp2p-Mutanten beruhten nicht auf Differenzen in der Expressionsstärke. So konnte in einer Immunoblot-Analyse gezeigt werden, dass alle Gbp2p-Mutanten in ähnlicher Stärke wie Gbp2p exprimiert und nicht degradiert wurden (Abb. 7D).

Die dargelegten Ergebnisse lassen vermuten, dass Sky1p die Serinreste 15 und 17 phosphoryliert und diese Modifizierung eine Voraussetzung für die nukleäre Lokalisierung von Gbp2p ist. Das Fehlen der Phosphorylierung hat demnach entweder eine Verlangsamung oder gänzliche Unterbindung des Kernimports von Gbp2p, eine Beschleunigung eines eventuell stattfindenden Kernexports von Gbp2p oder eine Kombination aus beidem zur Folge. Wie durch Überexpression von Mtr10p gezeigt werden konnte, ist der Kernimport von *gbp2*(S13/15/17A)p nicht gänzlich unterbunden. Hierzu



4.3 Gbp2p, Hrb1p und Npl3p pendeln in Abhängigkeit vom mRNA-Export zwischen Zellkern und Zytoplasma

In einer Exportstudie wurde untersucht, ob und in Abhängigkeit von welchen Faktoren Gbp2p und Hrb1p den Zellkern verlassen. Diese Studie beruhte auf dem Prinzip, dass pendelnde und vorrangig zytoplasmatische Proteine bei Vorliegen eines Exportdefekts deutlich sichtbar im Zellkern akkumulieren. Im Fall von Gbp2p konnte hier mit den zytoplasmatischen SA-Mutanten gearbeitet werden, da deren Kernimport wie gezeigt nicht gänzlich unterbunden ist (4.2). Im Fall von Hrb1p wurde die Tatsache genutzt, dass Hrb1p-GFP in einem Wildtyp-Stamm bei starker Expression durch den induzierbaren *GAL1*-Promotor im Zytoplasma akkumuliert (Abb. 8). Zu Vergleichszwecken wurde auch eine zytoplasmatische Variante von Npl3p, *npl3-27p*, mitgeführt (Krebber *et al.*, 1999).

gbp2(S15A)p-GFP (pHK431) und *Hrb1p*-GFP (*P_{GAL1}*) (pHK235) wurden in einem Wildtyp-Stamm (HKY36) und in verschiedenen Mutanten exprimiert. Hierbei handelte es sich um eine thermosensitive Mutante der RNA-Polymerase II (*rpb1-1*, HKY77), des Nukleoporins *Rat7p* (*rat7-1*, HKY124), der mRNA-Exportrezeptor-Komponenten *Mex67p* (*mex67-5*, HKY315) und *Mtr2p* (*mtr2-142*, HKY184), der RNA-Helikase *Dbp5p/Rat8p* (*rat8-1*, HKY90) sowie um eine Deletionsmutante der Arginin-Methyltransferase *Hmt1p* (*hmt1::HIS3*, HKY53). Das Verhalten von *npl3-27p* wurde in HKY15 (*npl3-27*) bzw. in entsprechenden Doppelmутanten analysiert (*rpb1-1 npl3-27*, HKY76; *rat7-1 npl3-27*, HKY28; *mex67-5 npl3-27*, HKY100; *mtr2-142 npl3-27*, HKY183; *rat8-1 npl3-27*, HKY89; *hmt1::HIS3 npl3-27*, HKY52). Zur Expression von *Hrb1p*-GFP wurde der *GAL1*-Promotor wie unter 3.9.2 beschrieben induziert und 2 h später durch Zugabe von Glukose reprimiert, um eine Verfälschung der Lokalisierung des Proteins durch die Neusynthese auszuschließen. Nach weiteren 2 h erfolgte ebenso wie bei den bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogenen *gbp2(S15A)-GFP*- und *npl3-27*-Stämmen eine 30 min Inkubation bei 37 °C. Die intrazelluläre Lokalisierung der Proteine wurde Fluoreszenzmikroskopisch ermittelt, *npl3-27p* wurde zuvor in einer indirekten Immunfluoreszenz (3.13.2) markiert.

Wie in Abb. 8 gezeigt, akkumulierten *gbp2(S15A)p*, *Hrb1p* und *npl3-27p* im Gegensatz zu einem NLS-NES-GFP-GFP-Kontrollprotein (pHK12) im Zellkern der *rpb1-1*-Mutante. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass alle drei Proteine den Zellkern in Abhängigkeit von der RNA-Polymerase II-Transkription verlassen. Eine nukleäre Akkumulation war überdies in den Mutanten *rat7-1* und *mex67-5* zu beobachten. Beide Stämme zeigen einen starken und innerhalb weniger Minuten einsetzenden mRNA-Exportdefekt bei der nicht-permissiven Temperatur von 37 °C (Gorsch *et al.*, 1995; Segref *et al.*, 1997 und ohne Abb.). Der Export von *Gbp2p* und *Hrb1p* scheint demnach ebenso wie bei *Npl3p* (Lee *et al.*, 1996;

Krebber *et al.*, 1999) eng mit dem Export von mRNA verknüpft zu sein. Interessanterweise zeichneten sich bei den übrigen Mutanten Unterschiede im Verhalten der drei Proteine ab (Abb. 8). So akkumulierten Hrb1p und npl3-27p, nicht aber gbp2(S15A)p, im Zellkern der *mtr2-142*-Zellen. In den *rat8-1*-Zellen war ausschließlich Hrb1p nukleär, und die Deletion von Hmt1p hemmte den Export von npl3-27p, in geringem Maße auch den von Hrb1p, nicht jedoch den Export von gbp2(S15A)p.

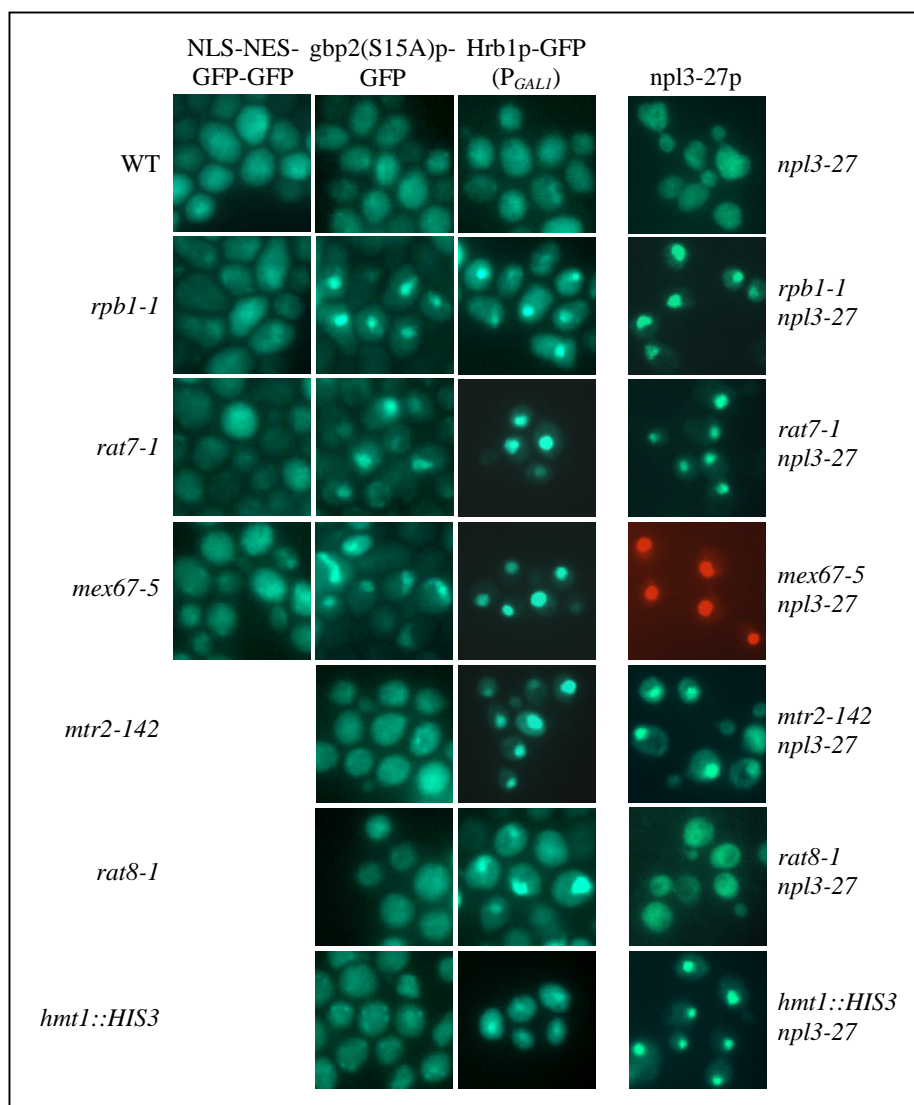


Abb. 8. Gbp2p, Hrb1p und Npl3p verlassen den Zellkern in Abhängigkeit von RNA-Polymerase II-Transkription und verschiedenen mRNA-Exportfaktoren. In einem Wildtyp-Stamm (WT) zytoplasmatische Versionen von Gbp2p (gbp2(S15A)p-GFP), Hrb1p (Hrb1p-GFP bei starker Expression durch *GAL1*-Promotor) und Npl3p (npl3-27p) wurden mittels Fluoreszenz-Mikroskopie in diversen Mutanten lokalisiert. Hierbei handelte es sich um eine Mutante der RNA-Polymerase II (*rpb1-1*), des Nukleoporins Rat7p, der mRNA-Exportrezeptor-Komponenten Mex67p und Mtr2p, der RNA-Helikase Dbp5p/Rat8p und der Arginin-Methyltransferase Hmt1p. Als Kontrolle ist die Lokalisierung eines NLS-NES-GFP-GFP-Fusionsproteins abgebildet. Alle Stämme wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und anschließend 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Markierung von npl3-27p geschah mit Hilfe eines Kaninchen-Anti-Npl3p-Antikörpers in einer indirekten Immunfluoreszenz.

Dass Gbp2p pendelt, konnte unabhängig in einem weiteren Experiment bestätigt werden. Hierzu wurden GFP-markierte Versionen von Gbp2p (pHK422), dem pendelnden Protein Npl3p (pHK144) und dem rein nukleären Protein Yrb2p (pHK241) (Taura *et al.*, 1998) unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors in einem Wildtyp-Stamm (HKY36) und einer thermosensitiven *mtr10-7*-Mutante (HKY270) exprimiert. Alle Zellen wurden bei der permissiven Temperatur von 18 °C angezogen. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase erfolgte die Induktion des *GAL1*-Promotors durch Zugabe von Galaktose zum Medium. Die Zellen wurden 2 h lang bei 18 °C inkubiert, anschließend zur Repression des Promotors für 1 h in glukosehaltigem Medium kultiviert und daraufhin geteilt. Eine Hälfte verblieb bei 18 °C, während die andere Hälfte 1 h lang bei der für den *mtr10-7*-Stamm nicht-permissiven Temperatur von 37 °C inkubierte. Die intrazelluläre Lokalisierung der Fusionsproteine wurde mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert. In dem Wildtyp-Stamm waren Gbp2p, Npl3p und Yrb2p sowohl bei 18 °C als auch bei 37 °C vorrangig nukleär (Abb. 9). Auch die *mtr10-7*-Zellen zeigten bei 18 °C eine nukleäre Lokalisierung der drei Fusionsproteine. Bei 37 °C hingegen akkumulierten Gbp2p und Npl3p, nicht aber das Kontrollprotein Yrb2p, deutlich im Zytoplasma (Abb. 9). Der Kernimport von Gbp2p und Npl3p war unter diesen Bedingungen durch die *mtr10-7*-Mutation spezifisch blockiert. Aufgrund der Repression des *GAL1*-Promotors können die zytoplasmatischen Signale nicht auf neusynthetisierte, sondern ausschließlich auf aus dem Zellkern exportierte Proteine zurückgeführt werden.

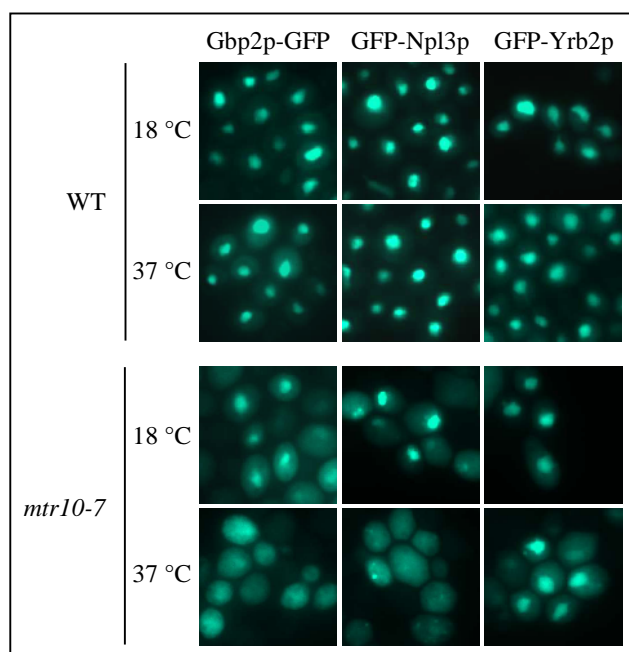


Abb. 9. Direkter Nachweis des Pendelns von Gbp2p. GFP-markierte Versionen von Gbp2p, dem pendelnden Protein Npl3p und dem nukleären Protein Yrb2p wurden unter Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors in einem Wildtyp-Stamm (WT) und einer *mtr10-7*-Mutante exprimiert. Hierzu wurden die Zellen bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 18 °C in raffinosehaltigem Medium angezogen. Anschließend erfolgte die Induktion des Promotors durch Zugabe von Galaktose. Nach 2 h Expression bei 18 °C wurde der Promotor durch Zugabe von Glukose reprimiert. 1 h später wurden die Kulturen geteilt und entweder bei 18 °C belassen oder für 1 h bei 37 °C inkubiert, um die *mtr10-7*-Mutation zu aktivieren und damit eine Blockierung Mtr10p-abhängiger Importprozesse herbeizuführen. Die Detektion der GFP-Fusionsproteine erfolgte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie.

4.4 Eine Überexpression von Gbp2p führt zu mRNA-Exportdefekten und kann *npl3*-Mutationen nicht supprimieren

Der Verlust von Gbp2p oder Hrb1p resultiert weder in einer veränderten Wachstumsrate unter Standardbedingungen noch in einer Kälte- oder Thermosensitivität der Zellen. So wurden ein Wildtyp-Stamm (HKY36), eine *GBP2*- und eine *HRB1*-Deletionsmutante (HKY257, HKY194) zusammen auf YPD-Agarplatten (3.9.2) ausgestrichen und für 4 Tage bei 16 °C, 25 °C oder 37 °C inkubiert. Die Stämme wuchsen bei allen Temperaturen vergleichbar schnell (ohne Abb.), *GBP2* und *HRB1* werden folglich unter den gegebenen Bedingungen nicht für das Zellwachstum benötigt (Konkel *et al.*, 1995; Shen *et al.*, 1998).

Mit diesem Ergebnis steht die Beobachtung in Einklang, dass keine der beiden Deletionsmutanten einen generellen mRNA-Exportdefekt aufweist. Beide Mutanten wurden bei 25 °C bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und entweder direkt verwendet oder zunächst für 30 min bzw. 3 h bei 37 °C inkubiert. Die intrazelluläre Lokalisierung der Poly(A)⁺-RNA wurde mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (3.14.1) mit einer Cyanin 3-markierten dT₅₀-Sonde analysiert. Die Mutanten zeigten ebenso wie ein zur Kontrolle mitgeführter Wildtyp-Stamm (HKY36) eine vorrangig zytoplasmatische Lokalisierung der mRNA (ohne Abb.).

Um zu überprüfen, wie sich andererseits eine starke Überexpression von Gbp2p oder Hrb1p auswirkt, wurde der Wildtyp-Stamm HKY36 mit pHK422 (*P_{GALI}:GBP2-GFP*), pHK235 (*P_{GALI}:HRB1-GFP*) oder pHK144 (*P_{GALI}:GFP-NPL3*) transformiert. Der starke, Galaktose-induzierbare *GALI*-Promotor und die hohe Kopienzahl dieser Plasmide gewährleisteten eine hohe Expressionsrate der Fusionsproteine. Zu Kontrollzwecken wurde zudem mit dem Plasmid pHK513 (*P_{ADH}:NLS-GFP-GFP*) gearbeitet, nachdem mittels Immunoblot und Fluoreszenz-Mikroskopie sichergestellt worden war, dass sich die Expressionsstärken der Plasmide in etwa entsprechen (Abb. 10B und ohne Abb.). Für einen Wachstumsvergleich wurden die verschieden transformierten Wildtyp-Zellen in raffinosehaltigem Medium angezogen, von gleichen Zellzahlen ausgehend in 1:10-Verdünnungen auf eine glukose- und eine galaktosehaltige Agarplatte getropft und bei 25 °C inkubiert. Wie in Abb. 10A gezeigt, wuchsen auf der reprimierenden Glukose-Platte alle Zellen ähnlich schnell. Auf der Galaktose-Platte hingegen war das Wachstum der Gbp2p-überexprimierenden Zellen gegenüber den Kontrollzellen deutlich verlangsamt. In noch extremerer Form zeigte sich dieser Phänotyp bei Npl3p-Überexpression (Flach *et al.*, 1994), während Hrb1p keinen Einfluss auf die Wachstumsrate hatte. Gbp2p und Npl3p sind im Gegensatz zu Hrb1p bei Überexpression vorrangig nukleär (Abb. 10B). Da die Kontrollzellen ebenfalls ein nukleäres GFP-Fusionsprotein exprimierten, ist die Toxizität spezifisch auf Gbp2p und Npl3p zurückzuführen.

Auf der Suche nach einer potentiellen Ursache der beobachteten Toxizität wurde die Lokalisierung der Poly(A)⁺-RNA in den überexprimierenden Zellen überprüft. Hierfür wurde nach Anzucht in raffinosehaltigem Medium, 4 h Induktion und 2 h Repression eine Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit einer Cyanin 3-markierten dT₅₀-Sonde durchgeführt. Weder die NLS-GFP-GFP- noch die Hrb1p-überexprimierenden Zellen zeigten einen mRNA-Exportdefekt. Im Gegensatz dazu akkumulierte bei ca. 25 % der Gbp2p- und ca. 50 % der Npl3p-überexprimierenden Zellen deutlich mRNA im Zellkern (Abb. 10B). Wie eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem Kaninchen-Anti-Npl3p-Antikörper ergab, beruhte der mRNA-Exportdefekt der Gbp2p-überexprimierenden Zellen nicht auf einer Misslokalisierung des endogenen Npl3p, welches vorrangig nukleär lokalisiert war (ohne Abb.).

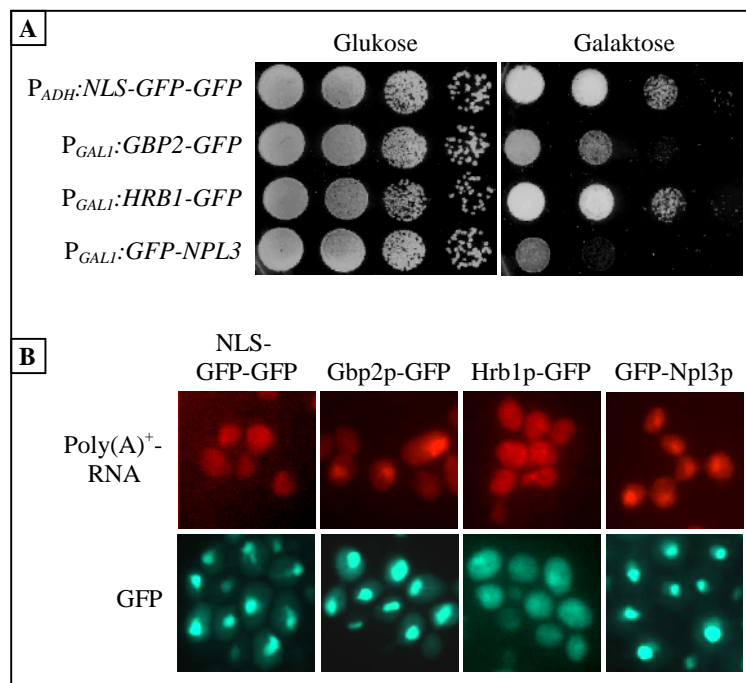


Abb. 10. Eine Überexpression von Gbp2p und Npl3p, nicht aber von Hrb1p, ist toxisch und führt zu mRNA-Exportdefekten. **A:** Wildtyp-Zellen, die in hoher Kopienzahl *GBP2-GFP*, *HRB1-GFP* oder *GFP-NPL3* unter Kontrolle des starken, Galaktose-induzierbaren *GAL1*-Promotors bzw. *NLS-GFP-GFP* unter Kontrolle des starken, konstitutiven *ADH*-Promotors enthielten, wurden bei 25 °C in raffinosehaltigem Medium angezogen. Von gleichen Zellzahlen ausgehend wurden 1:10-Verdünnungen der Kulturen auf eine Glukose- und eine Galaktose-Agarplatte getropft und für 3 (Glukose) bzw. 4 Tage (Galaktose) bei 25 °C inkubiert. **B:** Die in A gezeigten Zellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25 °C in raffinosehaltigem Medium angezogen. Anschließend erfolgte die Induktion des *GAL1*-Promotors durch Zugabe von Galaktose. Nach 4 h Expression wurde der Promotor durch Zugabe von Glukose reprimiert. 2 h später wurde die intrazelluläre Lokalisierung von Poly(A)⁺-RNA mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit einer Cyanin 3-markierten dT₅₀-Sonde analysiert. Die Detektion der GFP-Fusionsproteine erfolgte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie.

Der ähnliche Phänotyp Gbp2p- und Npl3p-überexprimierender Zellen konnte als Hinweis auf eine ähnliche und möglicherweise überlappende Funktion beider Proteine interpretiert werden. Da eine Deletion von *NPL3* lethal ist (Russell und Tollervey, 1992), kann endogenes Gbp2p den Verlust von Npl3p funktionell nicht oder nicht ausreichend ausgleichen. Im folgenden wurde daher überprüft, ob Gbp2p möglicherweise eine leichte Überexpression benötigt, um die thermosensitive *npl3-1*-Mutation (Lee *et al.*, 1996) zu supprimieren. Logarithmisch wachsende *npl3-1*-Zellen (HKY157 + pHK194 nach FOA), welche Gbp2p (pHK407), Hrb1p (pHK408) oder Npl3p (pHK196) von 2μ -Plasmiden exprimierten oder einen 2μ -Leervektor (pHK110) enthielten, wurden von gleichen Zellzahlen ausgehend in 1:10-Verdünnungen auf eine Agarplatte getropft und bei 36 °C inkubiert. Npl3p komplementierte den Wachstumsdefekt der Mutante erwartungsgemäß vollständig, während Hrb1p keinen, Gbp2p hingegen einen deutlich negativen Einfluss auf die Wachstumsrate hatte (Abb. 11). Ein ähnliches Ergebnis wurde bei Verwendung einer weiteren thermosensitiven *NPL3*-Mutante, *npl3-26* (Lee *et al.*, 1996) (HKY157 + pHK155 nach FOA), erhalten (ohne Abb.). Gbp2p und Hrb1p können Npl3p folglich funktionell nicht ersetzen. Interessanterweise war der durch die leichte Überexpression von Gbp2p erzeugte toxische Effekt in der *npl3-1*-Mutante deutlich stärker ausgeprägt als in einem Wildtyp-Stamm (HKY36) (Abb. 11). Eine Kombination aus *npl3-1*-Mutation und Gbp2p-Überexpression ist für die Zellen somit in erhöhtem Maße toxisch.

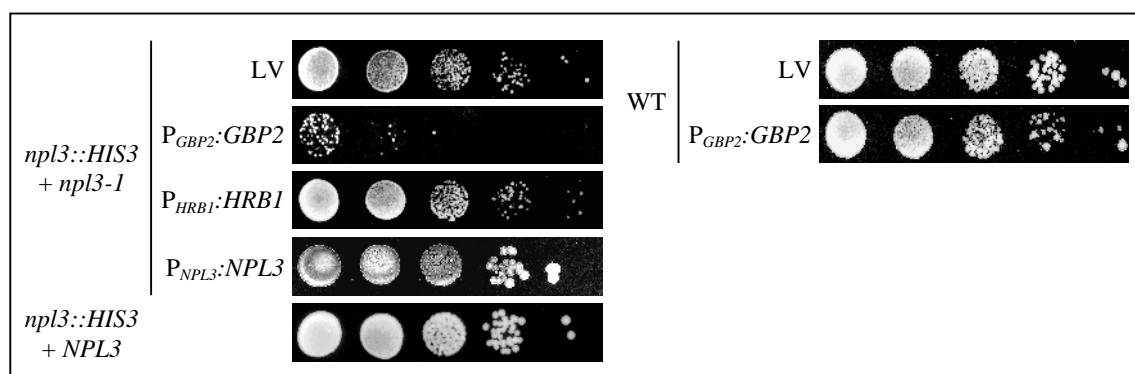


Abb. 11. Eine Überexpression von Gbp2p oder Hrb1p kann die *npl3-1*-Mutation nicht supprimieren, Gbp2p wirkt in *npl3-1*-Zellen hingegen in erhöhtem Maß toxisch. *npl3-1*-Zellen, die einen Leervektor (LV) enthielten oder Gbp2p, Hrb1p bzw. Npl3p von einem in hoher Kopienzahl vorliegenden 2μ -Plasmid exprimierten, wurden bei 25 °C bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Von gleichen Zellzahlen ausgehend wurden 1:10-Verdünnungen der Kulturen auf eine Agarplatte getropft und für 3 Tage bei 36 °C inkubiert. Als Kontrolle ist das Wachstum eines *NPL3*-Stammes sowie eines den Leervektor oder das *GBP2*-Plasmid enthaltenden Wildtyp-Stammes (WT) unter gleichen Bedingungen gezeigt.

4.5 Gbp2p und Hrb1p sind mit mRNA assoziiert

Der Besitz putativer RNA-Bindedomänen (4.1), die mRNA-Abhängigkeit des Kernexports beider Proteine (4.3) und der mRNA-Exportdefekt bei Gbp2p-Überexpression (4.4) legten die Vermutung nahe, dass es sich bei Gbp2p und Hrb1p um mRNA-Bindeproteine handelt. Um diese Hypothese *in vivo* zu überprüfen, wurde die Poly(A)⁺-RNA logarithmisch wachsender, Gbp2p-GFP- (HKY36 + pHK367) bzw. Hrb1p-GFP- (HKY181) exprimierender Wildtyp-Zellen nach UV-Quervernetzung über eine Oligo(dT)-Säule gereinigt (3.11.8). Die im Eluat enthaltenen mRNA-Bindeproteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und in Immunoblots mit Anti-GFP- und Anti-Npl3p-Antikörpern analysiert. Wie in Abb. 12A gezeigt, konnten Hrb1p und das als Positivkontrolle verwendete Npl3p deutlich im Eluat der UV-bestrahlten Proben detektiert werden. Gbp2p war hingegen nur äußerst schwach nachzuweisen. Interessanterweise wurde in *mtr10::HIS3*-Zellen (HKY97 nach FOA) eine Situation gefunden, in der die mRNA-Assoziation von Gbp2p weitaus besser zu erkennen war. Auch Npl3p war hier signifikant stärker an mRNA gebunden als im Wildtyp (Abb. 12A und B). Die starke mRNA-Bindung der beiden Proteine in diesem Stamm ist spezifisch, da das zytoplasmatische, nicht-mRNA-bindende Protein Yrb1p im Eluat der *mtr10::HIS3*-Zellen nicht detektiert werden konnte (Abb. 12A).

Eine verstärkte mRNA-Bindung von Npl3p in *MTR10*-Mutanten wurde bereits von Gilbert *et al.* (2001) beobachtet. Ferner zeigten die Autoren, dass neben Mtr10p auch eine Phosphorylierung durch Sky1p die mRNA-Bindung von Npl3p negativ beeinflusst. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Wie in Abb. 12B gezeigt, war die mRNA-Bindung von Npl3p in *sky1::TRP1*-Zellen (HKY267) oder von npl3-27p in Wildtyp-Zellen in demselben Maße erhöht wie die Bindung von Npl3p in *mtr10::HIS3*-Zellen. npl3-27p weist einen einzelnen Aminosäure-Austausch (E409K) auf, welcher die Phosphorylierung des Serinrestes S411 verhindert (vgl. Abb. 5) (Yun und Fu, 2000).

Um zu untersuchen, ob und inwieweit auch die mRNA-Bindung von Gbp2p durch die Sky1p-vermittelte Phosphorylierung des Proteins beeinflusst wird, wurde die Stärke der mRNA-Bindung von gbp2(S13/15/17A)p (pHK412) in Wildtyp-Zellen und von Gbp2p in *sky1::TRP1*-Zellen analysiert. Gegenüber dem Wildtyp war die Signalstärke in beiden Fällen leicht, jedoch bei weitem nicht in gleichem Ausmaß wie in *mtr10::HIS3*-Zellen erhöht (Abb. 12B).

Wie ein direkter Vergleich der Lysatkontrollen zeigte, differierten die intrazellulären Mengen der untersuchten Proteine in den verwendeten Stämmen kaum (Abb. 12A und ohne Abb.). Daher sind die erhöhten mRNA-Bindungen in den Phosphorylierungs-Mutanten und den *mtr10::HIS3*-Zellen vermutlich entweder auf eine Erhöhung der mRNA-Affinität oder

auf eine Verlangsamung der mRNA-Dissoziation der Proteine zurückzuführen. Dass es sich lediglich um durch die Misslokalisierungen der Proteine hervorgerufene Artefakte handelt, kann weitgehend ausgeschlossen werden, da die Stärken der Immunoblot-Signale nicht mit dem Ausmaß der Misslokalisierungen korrelierten. So ist nicht-phosphoryliertes Gbp2p ebenso wie Gbp2p in *mtr10::HIS3*-Zellen komplett zytoplasmatisch (Abb. 6C; Abb. 7), doch die Stärken der Immunoblot-Signale unterschieden sich deutlich (Abb. 12B). Zudem ist Npl3p in *sky1::TRP1*-Zellen leicht und in *MTR10*-Mutanten stark zytoplasmatisch (Abb. 17A), die entsprechenden Immunoblot-Signale waren indes gleich (Abb. 12B).

Zusammengefasst zeigen die dargelegten Ergebnisse folgendes: (1) Gbp2p und Hrb1p sind ebenso wie Npl3p mit mRNA assoziiert; (2) die mRNA-Bindung von Gbp2p und Npl3p wird von Sky1p-vermittelter Phosphorylierung und dem Importrezeptor Mtr10p negativ beeinflusst; (3) der Einfluss der Phosphorylierung auf die mRNA-Assoziation ist bei Gbp2p, nicht jedoch bei Npl3p, deutlich geringer als der Einfluss von Mtr10p.

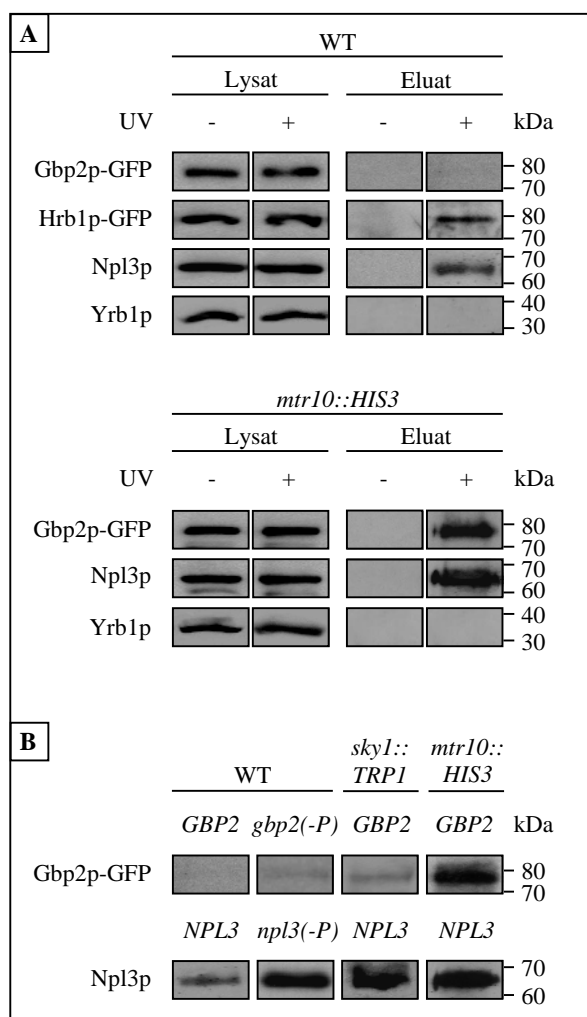


Abb. 12. Gbp2p und Hrb1p sind mRNA-Bindeproteine, und die mRNA-Bindung von Gbp2p ist in Phosphorylierungs-Mutanten und *mtr10::HIS3*-Zellen verstärkt. **A:** *In vivo*-Nachweis der Poly(A)⁺-RNA-Assoziation von Gbp2p und Hrb1p mittels UV-Quervernetzung. Gbp2p-GFP- bzw. Hrb1p-GFP-exprimierende Wildtyp-Zellen (WT) sowie Gbp2p-GFP-exprimierende *mtr10::HIS3*-Zellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25 °C angezogen, geerntet und zur kovalenten Vernetzung der Moleküle mit UV-Licht bestrahlt (-/+ UV). Nach Aufschluss der Zellen und Abnahme der gezeigten Lysatkontrollen erfolgte eine Reinigung der proteinbesetzten Poly(A)⁺-RNAs über Oligo(dT)-Säulen. Die Eluate wurden mit RNAsen behandelt und daraufhin mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Der spezifische Proteinnachweis erfolgte mit Anti-GFP- und Anti-Npl3p-Antikörpern. Zu Kontrollzwecken wurde das nicht-mRNA-bindende Protein Yrb1p mit einem Kaninchen-Anti-Yrb1p-Antikörper detektiert. **B:** Die mRNA-Assoziation von Gbp2p und Npl3p ist in Phosphorylierungs-Mutanten und *mtr10::HIS3*-Zellen verstärkt. Zur generellen Versuchsdurchführung siehe A. Verwendet wurden Gbp2p-GFP- und *gbp2(S13/15/17A)p*-GFP-exprimierende Wildtyp-Zellen (WT *GBP2/NPL3*, WT *gbp2(-P)*) sowie Gbp2p-GFP-exprimierende *sky1::TRP1*- und *mtr10::HIS3*-Zellen. Zu Vergleichszwecken wurde das Ergebnis eines auf identische Weise mit dem Stamm *npl3-27* (WT *npl3(-P)*) durchgeführten Experiments von H. Krebber, Marburg, zur Verfügung gestellt. Jede Spur wurde mit identischen Mengen an + UV-Eluat beladen. Der spezifische Nachweis der aufgetrennten Proteine erfolgte mit Anti-GFP- und Anti-Npl3p-Antikörpern.

4.6 Die pendelnden mRNA-Bindeproteine unterscheiden sich deutlich im Ausmaß der Assoziation mit aktiven Translationskomplexen

Um Einblicke in die zytoplasmatischen Umstrukturierungen der exportierten mRNPs zu erhalten, wurden die pendelnden mRNA-Bindeproteine mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation auf die Fähigkeit zur Kosedimentation mit aktiven Translationskomplexen hin untersucht (3.11.9). Zu diesem Zweck wurde der Wildtyp-Stamm HKY35 mit pHK20 (*MEX67-GFP*), pHK33 (*GFP-MTR10*), pHK258 (*CBP80-GFP*), pHK260 (*DBP5-myc*), pHK356 (*NAB2-GFP*), pHK367 (*GBP2-GFP*) oder pHK537 (*HRB1-GFP*) transformiert bzw. im Fall von Pab1p der Stamm HKY280 (*PAB1-GFP*) verwendet. Zur Arretierung der translatierenden Ribosomen auf den mRNA-Molekülen erfolgte der Zellaufschluss in Gegenwart von Cycloheximid. Die Zellextrakte wurden auf lineare Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und die Mono- und Polysomen durch Ultrazentrifugation von den freien ribosomalen Untereinheiten separiert. Die Absorption bei 254 nm spiegelt hierbei die Verteilung der ribosomalen RNA wider (Abb. 13). Die Gradienten wurden gleichmäßig fraktioniert und die in jeweils gleichen Volumina der einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine in Immunoblots mit Anti-GFP-, Anti-Hrp1p-, Anti-Npl3p- und Anti-myc-Antikörpern analysiert. Zu Kontrollzwecken wurde zudem ein Anti-Rps3p-Antikörper verwendet. Bei Rps3p handelt es sich um ein Protein der kleinen ribosomalen Untereinheit, welches erwartungsgemäß vorwiegend in den 40S-, mono- und polysomalen Fraktionen detektiert werden konnte (Abb. 13). Interessanterweise zeigten sich bei den analysierten mRNA-Bindeproteinen signifikante Unterschiede im Sedimentationsverhalten (Abb. 13). So akkumulierten die Cbp80p-, Hrp1p- und Nab2p-Moleküle nahezu ausschließlich in den nicht-ribosomalen Fraktionen. Ähnlich verhielt sich auch das Karyopherin Mtr10p. Demgegenüber war Mex67p zu ca. 15 % in den mono- und polysomalen Fraktionen zu detektieren, gefolgt von Hrb1p, Npl3p und Gbp2p mit ca. 30 % und Pab1p und Dbp5p mit ca. 40 bzw. 50 %. Die Quantifizierung der in den nicht-ribosomalen und den ribosomalen Fraktionen enthaltenen Proteinmengen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „Image Gauge 3.01“ (3.8). Der bei den Mex67p-, Hrb1p-, Npl3p-, Gbp2p- und Dbp5p-Banden sichtbare Höhenunterschied ist vermutlich auf eine Überladung der vorderen Spuren zurückzuführen.

Das Sedimentationsverhalten von Gbp2p, Npl3p und Dbp5p beruht auf einer spezifischen Assoziation mit Polysomen und nicht mit anderen hochmolekularen Komplexen. Dies sind die Ergebnisse von Kontrollexperimenten, bei denen das als Aminoacyl-tRNA-Analogon wirkende Antibiotikum Puromycin zur selektiven Zerstörung der Polysomen eingesetzt wurde (3.11.9). Die wachsenden Peptidketten werden im Verlauf der GTP-abhängigen Translationselongation auf Puromycin übertragen, woraufhin es zu einem vorzeitigen

Kettenabbruch und einer Dissoziation der Ribosomen von den mRNA-Molekülen kommt (Blobel und Sabatini, 1971). Logarithmisch wachsende, Gbp2p-GFP- (pHK367) bzw. Dbp5p-myc- (pHK260) exprimierende Wildtyp-Zellen (HKY35) wurden daher in diesem Fall ohne Zusatz des Elongations-Inhibitors Cycloheximid lysiert. Um die Stabilität anderer hochmolekularer Komplexe als der Polysomen nicht zu gefährden, enthielt der Lysepuffer keine erhöhten Salz- oder EDTA-Konzentrationen, welche die Puromycin-induzierte Ribosomen-Dissoziation wirksam unterstützen (Blobel und Sabatini, 1971). Die Zell-

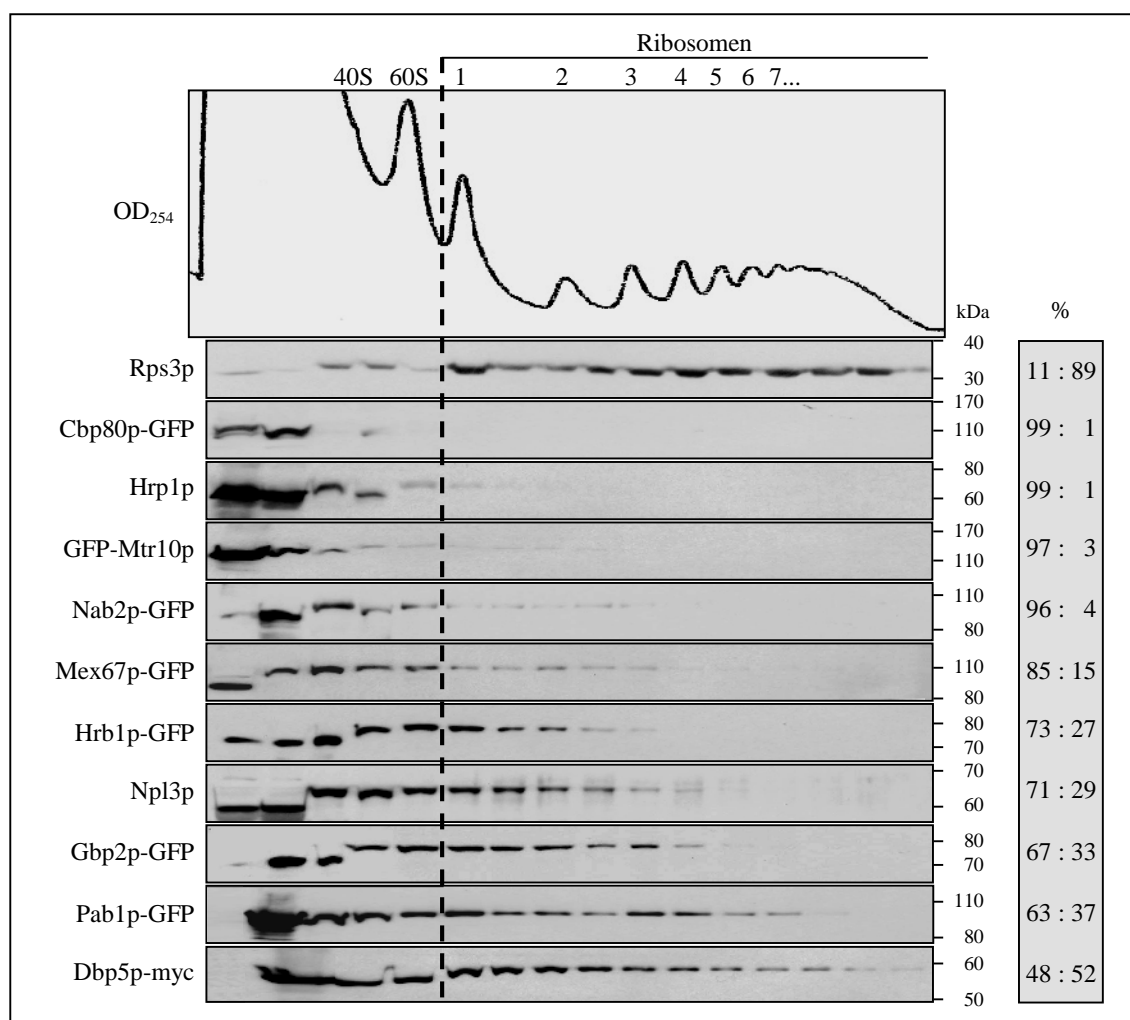


Abb. 13. Signifikante Mengen mehrerer pendelnder mRNA-Bindeproteine kosedimentieren mit Ribosomen. Extrakte Cbp80p-GFP-, GFP-Mtr10p-, Nab2p-GFP-, Mex67p-GFP-, Hrb1p-GFP-, Gbp2p-GFP-, Pab1p-GFP- sowie Dbp5p-myc-exprimierender Wildtyp-Zellen wurden auf lineare 15-50 %ige Saccharose-Dichtegradien aufgetragen und zentrifugiert. Während der sich anschließenden Fraktionierung konnte die Verteilung der ribosomalen RNA durch kontinuierliche Messung der Absorption bei 254 nm verfolgt werden (oben). Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden gefällt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und in Immunoblots mit Anti-Rps3p-, Anti-GFP-, Anti-Hrp1p-, Anti-Npl3p- und Anti-myc-Antikörpern analysiert (unten). Rechts sind die Werte einer Quantifizierung der in den nicht-ribosomalen (links der gestrichelten Linie) und in den ribosomalen Fraktionen (rechts der gestrichelten Linie) enthaltenen Proteinmengen gezeigt. Die Experimente wurden zwei- bis dreifach unabhängig wiederholt, die abgebildeten Ergebnisse sind repräsentativ.

extrakte wurden mit Puromycin und GTP oder zur Negativkontrolle mit A. dest. versetzt und für 15 min bei 22 °C (bei Gbp2p und Npl3p) bzw. für 22 min bei 30 °C (bei Dbp5p) inkubiert. Die Inkubationsdauer und -temperatur orientierte sich hierbei in erster Linie an der Stabilität der jeweiligen Proteine. Im Anschluss wurden die Extrakte auf Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen, zentrifugiert, fraktioniert und in Immunoblots analysiert. Wie anhand der Rps3p-Profile zu erkennen ist, resultierte der Zusatz von Puromycin und GTP in einem Rückgang der Polysomen bei gleichzeitiger Zunahme der Monosomen (Abb. 14). Letzteres ist auf eine Reassoziierung der dissoziierten, funktionsfähigen ribosomalen Unter-einheiten im Verlauf der Zentrifugation zurückzuführen (Blobel und Sabatini, 1971). Daher

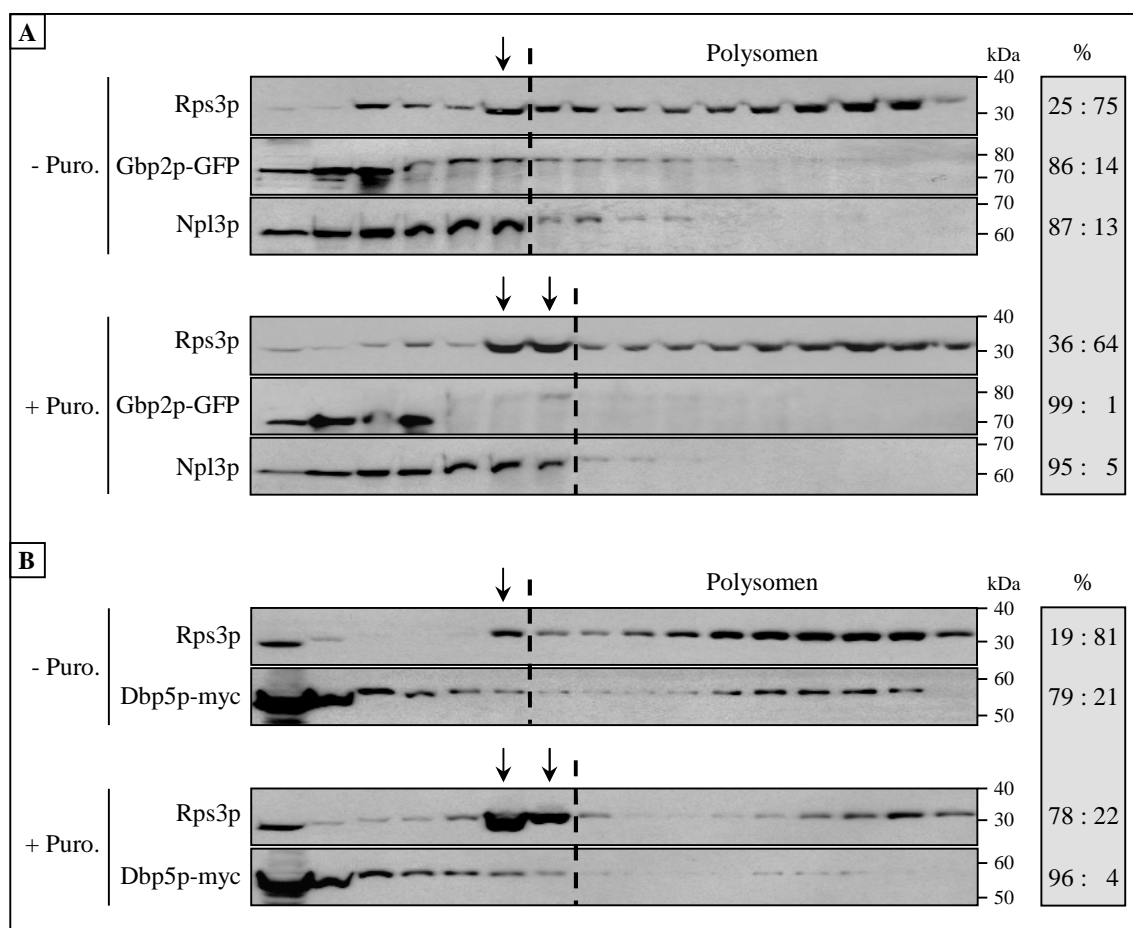


Abb. 14. Gbp2p, Npl3p und Dbp5p sind spezifisch mit Polysomen assoziiert. **A:** Extrakte Gbp2p-GFP-exprimierender Wildtyp-Zellen wurden mit A. dest. (- Puro.) oder zur selektiven Zerstörung der Polysomen mit Puromycin und GTP (+ Puro.) versetzt und für 15 min bei 22 °C inkubiert. Da die Wirkung von Puromycin auf fortlaufender Translationselongation basiert, unterblieb die Zugabe des Elongations-Inhibitors Cycloheximid. Die Extrakte wurden auf lineare 15-50 %ige Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen, zentrifugiert und fraktioniert. Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden gefällt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und in Immunoblots mit Anti-Rps3p-, Anti-GFP- und Anti-Npl3p-Antikörpern analysiert. Die Pfeile markieren die monosomalen Fraktionen. Rechts sind die Werte einer Quantifizierung der in den nicht-polysomalen (links der gestrichelten Linie) und in den polysomalen Fraktionen (rechts der gestrichelten Linie) enthaltenen Proteinmengen gezeigt. **B:** Extrakte Dbp5p-myc-exprimierender Wildtyp-Zellen wurden wie unter A behandelt, vor der Auftragung auf die Gradienten allerdings für 22 min bei 30 °C inkubiert. Die Detektion von Dbp5p-myc erfolgte mit einem Anti-myc-Antikörper.

wurden hier nicht die in den ribosomalen und nicht-ribosomalen, sondern die in den polysomalen und nicht-polysomalen Fraktionen enthaltenen Proteinmengen miteinander verglichen. Aufgrund der modifizierten Auswertung wichen die errechneten Proteinverhältnisse bereits in den unbehandelten Kontrollen deutlich von den in Abb. 13 gezeigten Werten ab (Abb. 14). Weitere Gründe sind der Wegfall der Cycloheximid-Behandlung und die beginnende Degradierung der Polysomen und Proteine im Verlauf der Inkubation der Extrakte. In den Puromycin-behandelten Proben war parallel zu dem Rückgang der Polysomen eine signifikante Reduzierung von Gbp2p, Npl3p und Dbp5p in den polysomalen Fraktionen zu beobachten (Abb. 14). Aufgrund der intensiveren Inkubation war dieser Effekt bei den Dbp5p-Proben am deutlichsten.

In einem auf ähnliche Weise mit Hrb1p-GFP-exprimierenden Wildtyp-Zellen durchgeführten Experiment konnte auch für Hrb1p eine Polysomen-Assoziation nachgewiesen werden (D. Sturm und H. Krebber, Marburg, persönliche Mitteilung).

4.7 Die mRNA-Dissoziation von Npl3p geschieht durch Mtr10p, nicht aber durch Sky1p

Wie unter 4.5 dargelegt, führen Mutationen von *SKY1* und *MTR10* zu einer im Vergleich zum Wildtyp signifikant verstärkten mRNA-Bindung von Npl3p. In beiden Fällen akkumuliert Npl3p zudem im Zytoplasma, obgleich die Misslokalisierung in *sky1::TRP1*-Zellen deutlich weniger ausgeprägt ist als in *MTR10*-Mutantenstämmen (Abb. 17A). Eine verlangsamte Ablösung von der mRNA im Zytoplasma wäre daher die direkteste Erklärung für die verstärkten mRNA-Bindungen. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde untersucht, ob in *SKY1*- und *MTR10*-Mutanten möglicherweise eine verstärkte Assoziation von Npl3p mit aktiven Translationskomplexen zu beobachten ist. Zu diesem Zweck wurden logarithmisch wachsende *sky1::TRP1*- (HKY267) und isogene Wildtyp-Zellen (HKY268) sowie bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogene und für 30 min bei 37 °C inkubierte *mtr10-7*- (HKY270) und isogene *MTR10*-Zellen (HKY271) in Gegenwart von Cycloheximid aufgeschlossen. Wie unter 4.6 beschrieben, folgten eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation, eine Fraktionierung der Gradienten sowie eine gelelektrophoretische Auftrennung und immunologische Detektion der fraktionierten Proteine. Während die Deletion von *SKY1* keinen Einfluss auf die Polysomen-Assoziation von Npl3p hatte (Abb. 15), war das Protein interessanterweise deutlich in den polysomalen Fraktionen der *mtr10-7*-Zellen angereichert (Abb. 16A). Hierbei könnte es sich entweder um einen Hinweis auf die Beteiligung des Importrezeptors Mtr10p an der mRNA-Dissoziation von Npl3p oder um ein durch die starke zytoplasmatische Akkumulation des Proteins hervorgerufenen Artefakt handeln. Um daher festzustellen, ob eine starke zytoplasmatische

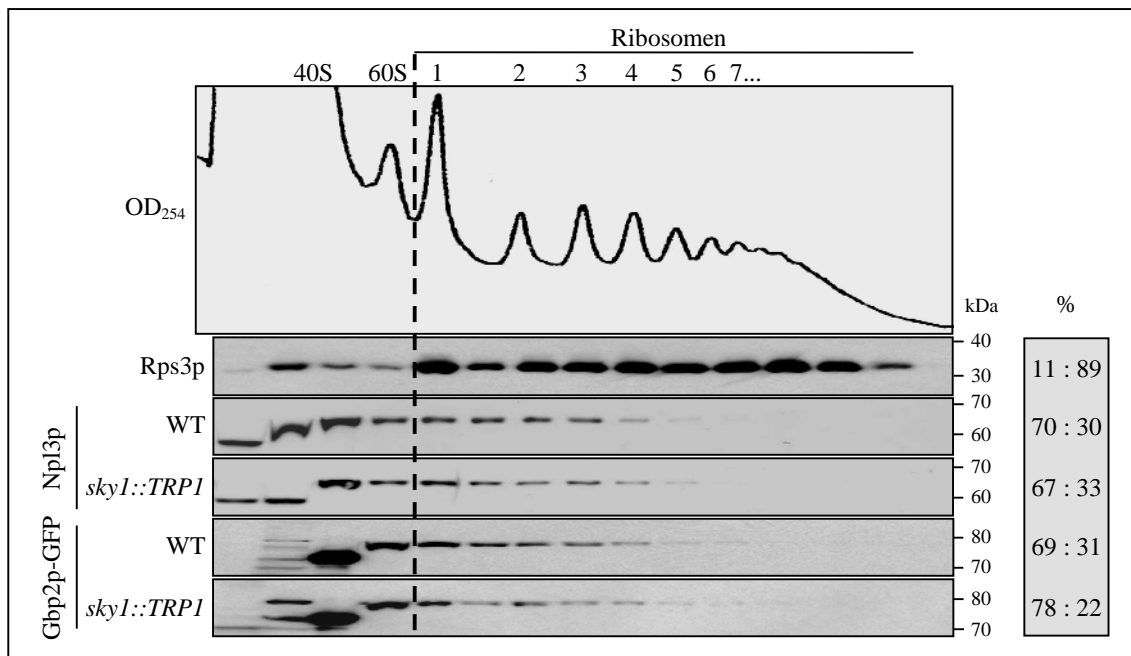


Abb. 15. Die Deletion von *SKY1* hat keinen Einfluss auf die Polysomen-Assoziation von Npl3p und Gbp2p. Extrakte Gbp2p-GFP-exprimierender Wildtyp- und *sky1::TRP1*-Zellen wurden auf lineare 15-50 %ige Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und zentrifugiert. Während der sich anschließenden Fraktionierung konnte die Verteilung der ribosomalen RNA durch kontinuierliche Messung der Absorption bei 254 nm verfolgt werden (oben). Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden gefällt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und in Immunoblots mit Anti-Rps3p-, Anti-Npl3p- und Anti-GFP-Antikörpern analysiert (unten). Rechts sind die Werte einer Quantifizierung der in den nicht-ribosomalen (links der gestrichelten Linie) und in den ribosomalen Fraktionen (rechts der gestrichelten Linie) enthaltenen Proteinmengen gezeigt. Die Experimente wurden dreifach unabhängig wiederholt, die abgebildeten Ergebnisse sind repräsentativ.

Akkumulation generell mit einer verstärkten Polysomen-Assoziation des betreffenden Proteins korreliert, wurden die Kosedimentations-Experimente mit Gbp2p-GFP- (pHK367) exprimierenden *sky1::TRP1*- (HKY267) und isogenen Wildtyp-Zellen (HKY268) wiederholt. Wie in Abb. 15 gezeigt, war das in den *sky1::TRP1*-Zellen stark misslokalisierte Gbp2p (Abb. 7A) nicht vermehrt in den polysomalen Fraktionen zu detektieren.

Da die verstärkte Polysomen-Assoziation von Npl3p den Translationsvorgang beeinflussen könnte, wurde die Geschwindigkeit der Neusynthese eines Reporterproteins in *mtr10-7*- (HKY270) und isogenen *MTR10*-Zellen (HKY271 + pHK414 nach FOA) verfolgt. Die Zellen wurden zu diesem Zweck mit dem Plasmid pHK231 (P_{GALI} :GFP) transformiert, bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25 °C in raffinosehaltigem Medium angezogen und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Darauf folgten die Galaktose-Induktion des *GALI*-Promotors und eine weitere Inkubation bei 37 °C. Unmittelbar vor (0 min) sowie 5, 10 und 20 min nach der Induktion wurde spektralphotometrisch die Zelldichte ermittelt (3.9.2), jeweils eine zu 10 ml einer OD₆₀₀ von 0,6 korrespondierende Zellmenge (= 6 OD) geerntet und in SDS-Probenpuffer aufgeschlossen. Eine Immunodetektion mit einem Anti-GFP-Antikörper gab nach gelelektrophoretischer Auftrennung gleicher Lysat-Volumina

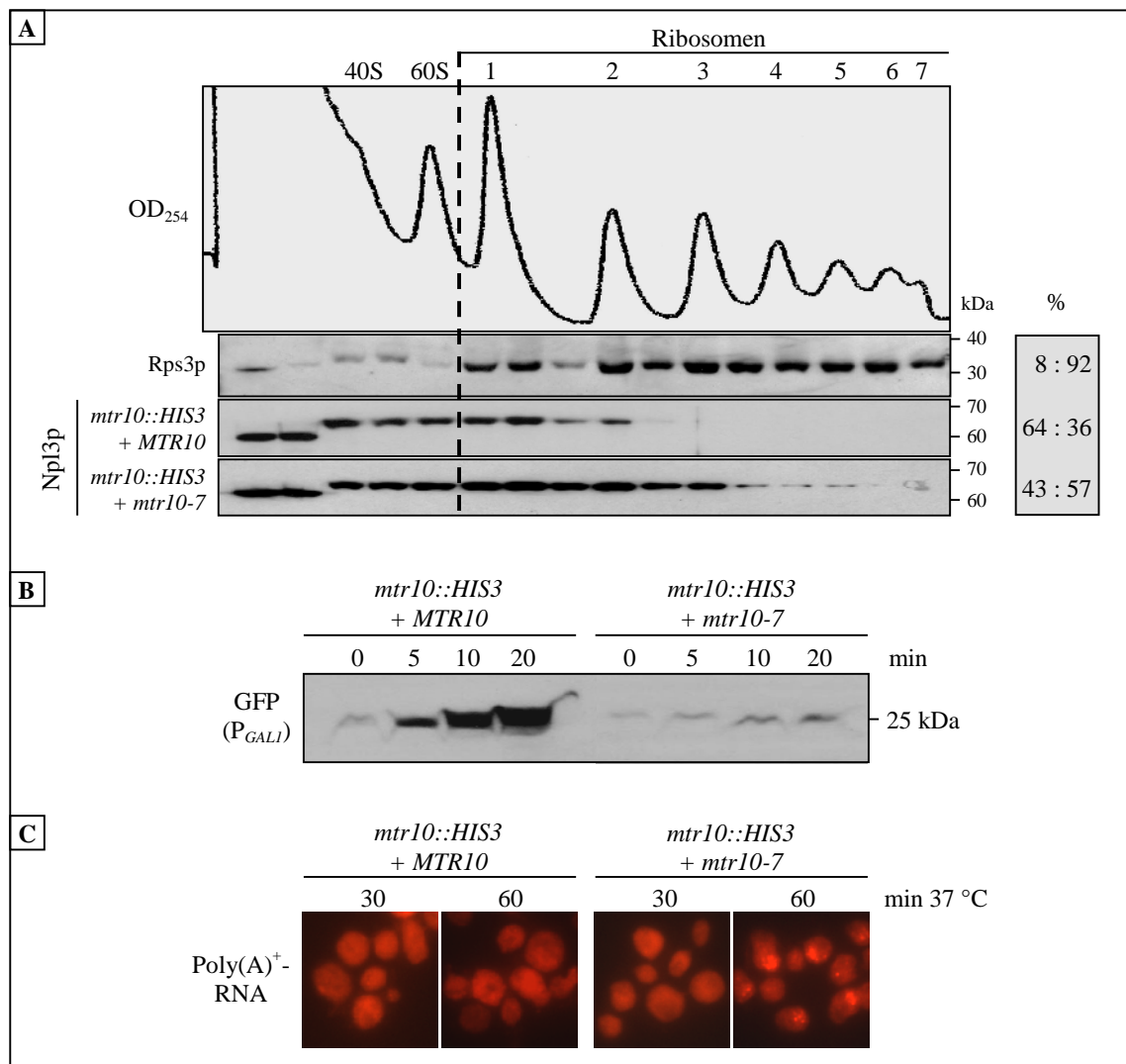


Abb. 16. *mtr10-7*-Zellen zeigen eine verstärkte Assoziation von Npl3p mit aktiven Translationskomplexen und eine verlangsamte Proteinsynthese. **A:** Die Assoziation von Npl3p mit aktiven Translationskomplexen ist in *mtr10-7*-Zellen verstärkt. Extrakte für 30 min bei 37 °C inkubierter *MTR10*- und *mtr10-7*-Zellen wurden auf lineare 15-50 %ige Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und zentrifugiert. Während der sich anschließenden Fraktionierung konnte die Verteilung der ribosomalen RNA durch kontinuierliche Messung der Absorption bei 254 nm verfolgt werden (oben). Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden gefällt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und in Immunoblots mit Anti-Rps3p- und Anti-Npl3p-Antikörpern analysiert (unten). Rechts sind die Werte einer Quantifizierung der in den nicht-ribosomalen (links der gestrichelten Linie) und in den ribosomalen Fraktionen (rechts der gestrichelten Linie) enthaltenen Proteinmengen gezeigt. Das Experiment wurde dreifach unabhängig wiederholt, die abgebildeten Ergebnisse sind repräsentativ. **B:** Die Neusynthese eines Reporterproteins ist in *mtr10-7*-Zellen signifikant verlangsamt. *MTR10*- und *mtr10-7*-Zellen, die das *GFP*-Gen unter Kontrolle des Galaktose-induzierbaren *GAL1*-Promotors enthielten, wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25 °C in raffinosehaltigem Medium angezogen und vor der Induktion für 15 min bei 37 °C inkubiert. Unmittelbar vor (0 min) sowie 5, 10 und 20 min nach der Induktion wurden identische Zellmengen geerntet und lysiert. Die Detektion der in den Ganzzelextrakten enthaltenen GFP-Moleküle erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit einem Anti-GFP-Antikörper. **C:** *mtr10-7*-Zellen zeigen keinen mRNA-Export-Defekt nach 30 min Inkubation bei 37 °C. *MTR10*- und *mtr10-7*-Zellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25 °C angezogen und daraufhin für 30 bzw. 60 min bei 37 °C inkubiert. Die intrazelluläre Lokalisierung der Poly(A)⁺-RNA wurde mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit einer Cyanin 3-markierten dT₅₀-Sonde analysiert.

Aufschluss über den Verlauf der GFP-Neusynthese. Während in den *MTR10*-Zellen eine deutliche Induktion stattgefunden hatte, war in den *mtr10-7*-Zellen über den beobachteten Zeitraum hinweg lediglich ein sehr leichter Anstieg der GFP-Menge zu verzeichnen (Abb. 16B).

Wie eine Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit einer Cyanin 3-markierten dT₅₀-Sonde zeigte, weisen *mtr10-7*-Zellen frühestens nach 60 min Inkubation bei der nicht-permissiven Temperatur einen sichtbaren mRNA-Exportdefekt auf (Abb. 16C). Demnach ist nicht davon auszugehen, dass die nach 15 bis 30 min Inkubation bei 37 °C beobachteten Effekte auf den mRNA-Exportdefekt der *mtr10-7*-Zellen zurückgehen.

Zusammengefasst zeigen die dargelegten Ergebnisse folgendes: (1) Die mRNA-Dissoziation von Npl3p und Gbp2p ist unabhängig von Sky1p; (2) die mRNA-Dissoziation von Npl3p ist abhängig von Mtr10p; (3) die Protein-Neusynthese ist in *mtr10-7*-Zellen verlangsamt.

4.8 Eine rechtzeitige Npl3p-Dissoziation von der mRNA ist die Voraussetzung für eine effektive Translation

Bei Mtr10p handelt es sich um den Importrezeptor mehrerer mRNA-Bindeproteine, so dass es mit Hilfe von *MTR10*-Mutanten schwierig ist, einen potentiellen Translationsdefekt konkret und ausschließlich auf eine verstärkte Polysomen-Assoziation von Npl3p zurückzuführen. Um die Zusammenhänge eingehender zu untersuchen, wurde daher stattdessen die Mutante *npl3-27* genutzt. Wie bereits unter 4.5 erwähnt, weist *npl3-27p* einen einzelnen Aminosäure-Austausch (E409K) auf, welcher die Serin-Phosphorylierung des Moleküls durch Sky1p verhindert. Ebenso wie Npl3p in *sky1::TRP1*-Zellen ist *npl3-27p* demgemäß bei 25 °C leicht zytoplasmatisch (Abb. 17A). Bei 37 °C allerdings verstärkt sich die Misslokalisierung von *npl3-27p* im Gegensatz zu derjenigen von Npl3p in *sky1::TRP1*-Zellen drastisch (Abb. 17A) und kann demnach nicht mehr allein auf die fehlende Phosphorylierung zurückgeführt werden. Vielmehr entspricht sie der Lokalisierung von Npl3p in *MTR10*-Mutanten, was einen Defekt in der Erkennung des Proteins durch Mtr10p nahelegt. Für diese Theorie spricht weiterhin, dass die *npl3-27*-Mutation in dem von Mtr10p erkannten Kernlokalisierungssignal liegt, welches sich zwischen den Aminosäureresten 283 und 414 erstreckt (Senger *et al.*, 1998) (vgl. Abb. 5), und dass die Misslokalisierung durch Überexpression von Mtr10p zu revertieren ist (Abb. 17A; Krebber *et al.*, 1999).

Um festzustellen, ob *npl3-27p* ebenso wie Npl3p in *mtr10-7*-Zellen verstärkt mit aktiven Translationskomplexen assoziiert ist, wurden Kosedimentations-Experimente mit dem Extrakt für 1 h bei 37 °C inkubierter *npl3-27*- (HKY351) und isogener Wildtyp-Zellen (HKY352) (3.11.6) durchgeführt. Wie in Abb. 17B gezeigt, war *npl3-27p* in der Tat

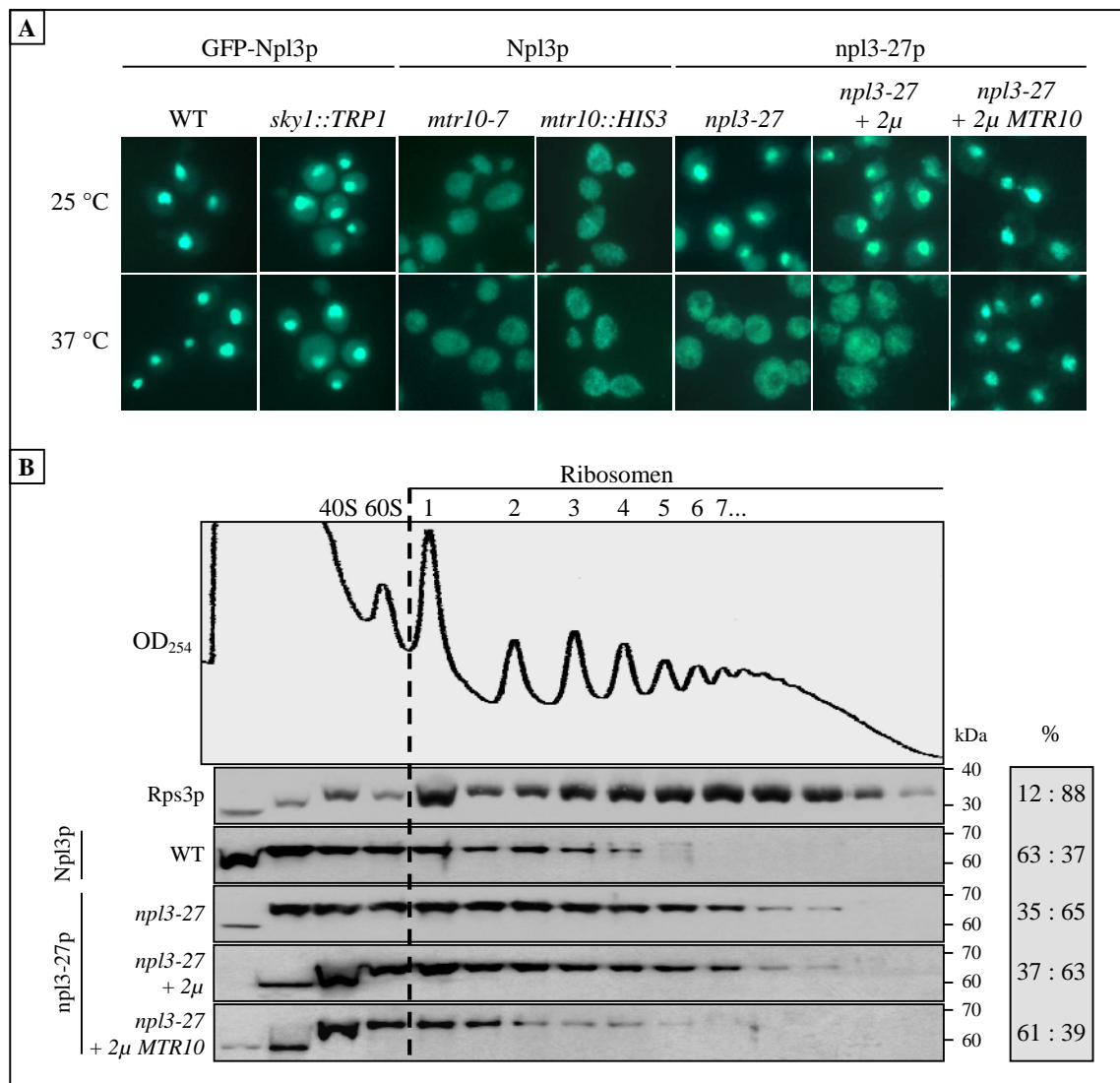


Abb. 17. npl3-27p ist verstärkt mit aktiven Translationskomplexen assoziiert. A: Bei 37 °C ist die Misslokalisierung von *npl3-27* deutlich stärker als diejenige von Npl3p in *sky1::TRP1*-Zellen. Gezeigt ist eine Fluoreszenz-mikroskopische Analyse der Lokalisierung von GFP-Npl3p in Wildtyp- und *sky1::TRP1*-Zellen, von Npl3p in *mtr10-7*- und *mtr10::HIS3*-Zellen sowie von npl3-27p in *npl3-27*-Zellen, *npl3-27*-Zellen mit leerem 2 μ -Plasmid und *npl3-27*-Zellen mit *MTR10* auf einem 2 μ -Plasmid. Alle Stämme wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen, die Kulturen daraufhin geteilt und für 30 min bei 25 °C oder 37 °C inkubiert. Die Markierung von Npl3p und npl3-27p geschah mit Hilfe eines Anti-Npl3p-Antikörpers in einer indirekten Immunfluoreszenz. **B:** npl3-27p ist in den polysomalen Fraktionen angereichert, und dieser Effekt ist durch Überexpression von Mtr10p zu revertieren. Extrakte für 1 h bei 37 °C inkubierter Wildtyp- und *npl3-27*-Zellen, *npl3-27*-Zellen mit leerem 2 μ -Plasmid und *npl3-27*-Zellen mit *MTR10* auf einem 2 μ -Plasmid wurden auf lineare 15-50 %ige Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen und zentrifugiert. Während der sich anschließenden Fraktionierung konnte die Verteilung der ribosomalen RNA durch kontinuierliche Messung der Absorption bei 254 nm verfolgt werden (oben). Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden gefällt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und in Immunoblots mit Anti-Rps3p- und Anti-Npl3p-Antikörpern analysiert (unten). Rechts sind die Werte einer Quantifizierung der in den nicht-ribosomalen (links der gestrichelten Linie) und in den ribosomalen Fraktionen (rechts der gestrichelten Linie) enthaltenen Proteinmengen gezeigt. Die Experimente wurden dreifach unabhängig wiederholt, die abgebildeten Ergebnisse sind repräsentativ.

signifikant in den polysomalen Fraktionen angereichert, und dieser Effekt konnte durch Überexpression von *MTR10* (pHK13) revertiert werden.

Die Mutante *npl3-27* bot sich folglich dafür an, speziell und detailliert die Auswirkungen einer verstärkten Polysomen-Assoziation von Npl3p auf die Translationseffizienz zu untersuchen. Zunächst wurde auch in diesem Fall die Geschwindigkeit der GFP-Neusynthese verfolgt. Mit dem Plasmid pHK231 ($P_{GALI}:GFP$) transformierte *npl3-27*- (HKY351) und isogene Wildtyp-Zellen (HKY352) wurden hierzu bis zur logarithmischen Wachstumsphase in raffinosehaltigem Medium angezogen und vor der Induktion des *GALI*-Promotors für 30 min bei 37 °C inkubiert. Auch nach der Induktion verblieben die Kulturen bei 37 °C. Unmittelbar vor (0 min) sowie 5, 10 und 20 min nach der Induktion wurde spektral-photometrisch die Zelldichte ermittelt, jeweils eine zu 10 ml einer OD₆₀₀ von 0,6 korrespondierende Zellmenge (= 6 OD) geerntet und in SDS-Probenpuffer aufgeschlossen. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung gleicher Lysat-Volumina erfolgte die Detektion der GFP-Moleküle mit einem Anti-GFP-Antikörper. Ebenso wie in der Mutante *mtr10-7* (Abb. 16B) war in *npl3-27* über den beobachteten Zeitraum hinweg ein lediglich leichter Anstieg der GFP-Menge zu verzeichnen, während in den Wildtyp-Zellen erwartungsgemäß eine deutliche Induktion stattfand (Abb. 18A).

Die verlangsamte GFP-Neusynthese beruhte nicht auf einer verringerten Menge an GFP-mRNA in den *npl3-27*-Zellen. Dies zeigten reverse Transkriptionen mit anschließender semi-quantitativer PCR (RT-PCR) (3.14.3), welche mit jeweils 100 ng DNA-freier Gesamt-RNA als Matrize durchgeführt wurden. Zur Extraktion der Gesamt-RNA (3.11.3) waren die Zellen wie oben beschrieben angezogen, induziert und geerntet worden. Mit Hilfe der als Startermoleküle gewählten Oligonukleotide HK225/HK226 und HK267/HK268 (3.5) konnten *GFP* und das als interner Standard dienende, endogene *NAB2* parallel im selben Ansatz amplifiziert werden. Wie in Abb. 18B gezeigt, lag die mRNA von *NAB2* sowohl vor als auch nach der Induktion in vergleichbarer Konzentration in den Zellen vor. Die Transkription von *GFP* hingegen wurde in beiden Stämmen deutlich und vor allem in etwa gleicher Stärke induziert.

Interessanterweise zeigten die *npl3-27*-Zellen neben der Verlangsamung der Protein-Neusynthese auch eine signifikante Reduzierung des Gesamt-Proteingehalts. Eine zu 10 ml einer OD₆₀₀ von 0,6 korrespondierende Menge (= 6 OD) logarithmisch wachsender und für 3 h bei 37 °C inkubierter *npl3-27*- (HKY351) und Wildtyp-Zellen (HKY352) wurde in SDS-Probenpuffer lysiert. Die in gleichen Lysat-Volumina enthaltenen Proteine wurden entweder mittels SDS-PAGE analysiert oder photometrisch quantifiziert (3.12.2). In der *npl3-27*-Mutante war der Gesamt-Proteingehalt um nahezu 50 % verringert, wobei diese Reduzierung allerdings nicht alle Proteinbanden in gleichem Maße betraf (Abb. 18C). Ein

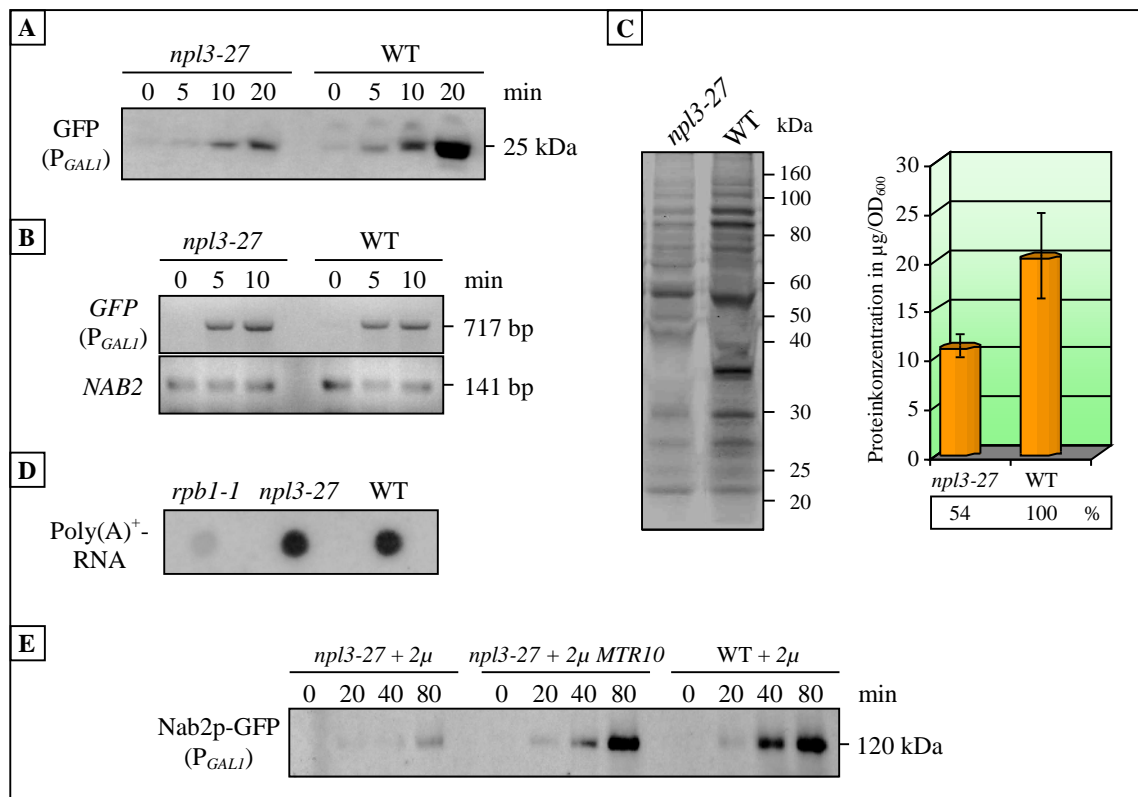


Abb. 18. *npl3-27*-Zellen zeigen einen Defekt in der Proteinsynthese, welcher nicht auf Transkriptionsdefekten beruht und durch Überexpression von *Mtr10p* zu supprimieren ist. **A:** Die Neusynthese eines Reporterproteins ist in *npl3-27*-Zellen signifikant verlangsamt. *npl3-27*- und isogene Wildtyp-Zellen (WT), die das *GFP*-Gen unter Kontrolle des Galaktose-induzierbaren *GALI*-Promotors enthielten, wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25 °C in raffinosehaltigem Medium angezogen und vor der Induktion für 30 min bei 37 °C inkubiert. Unmittelbar vor (0 min) sowie 5, 10 und 20 min nach der Induktion wurden identische Zellmengen geerntet und lysiert. Die Detektion der in den Ganzzellextrakten enthaltenen GFP-Moleküle erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit einem Anti-GFP-Antikörper. **B:** Anzucht, Induktion und Ernte der Zellen wie unter A. Nach Extraktion der Gesamt-RNA wurden jeweils 100 ng dieser RNA als Matrize in eine RT-PCR zur Amplifizierung von *GFP* und endogenem *NAB2* eingesetzt. **C:** Der Gesamt-Proteingehalt ist in *npl3-27*-Zellen signifikant reduziert. *npl3-27*- und isogene Wildtyp-Zellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen, für 3 h bei 37 °C inkubiert, in identischer Menge geerntet und in SDS-Probenpuffer aufgeschlossen. Die Proteine wurden anschließend entweder auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (links) oder photometrisch quantifiziert (rechts). Das Diagramm zeigt die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. **D:** *npl3-27*-Zellen haben keinen generellen Transkriptionsdefekt. Logarithmisch wachsende *rpb1-1*-, *npl3-27*- und Wildtyp-Zellen wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert. Aus identischen Zellmengen wurde Gesamt-RNA isoliert, auf eine Nylonmembran getropft und zur Detektion der Poly(A)⁺-RNA mit einer ³²P-markierten Poly(dT)-Sonde hybridisiert. **E:** Eine Überexpression von *Mtr10p* supprimiert den Proteinsynthese-Defekt des *npl3-27*-Stammes. *npl3-27*- und isogene Wildtyp-Zellen, welche entweder ein leeres 2µ-Plasmid oder *MTR10* auf einem 2µ-Plasmid trugen und zudem *NAB2-GFP* unter Kontrolle des Galaktose-induzierbaren *GALI*-Promotors enthielten, wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25 °C in raffinosehaltigem Medium angezogen und vor der Induktion für 30 min bei 37 °C inkubiert. Unmittelbar vor (0 min) sowie 20, 40 und 80 min nach der Induktion wurden identische Zellmengen geerntet und lysiert. Die Detektion der in den Ganzzellextrakten enthaltenen GFP-Moleküle erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit einem Anti-GFP-Antikörper.

identisches Ergebnis wurde bei Aufschluss von jeweils $2,5 \times 10^8$ Hefezellen erhalten (ohne Abb.).

Um weitmöglichst auszuschließen, dass die beobachteten Probleme bei der Proteinsynthese auf stromaufwärts der Translation gelegene Defekte zurückgehen, wurde der *npl3-27*-Stamm zum einen auf generelle Defekte bei der Transkription hin untersucht. So wurde aus einer zu 50 ml einer OD von 0,5 korrespondierenden Menge (= 25 OD) logarithmisch wachsender und für 30 min bei 37 °C inkubierter *rpb1-1*- (HKY77), *npl3-27*- (HKY351) und Wildtyp-Zellen (HKY352) die Gesamt-RNA isoliert. Nach dem Auftropfen gleicher Volumina dieser Proben auf eine Nylonmembran konnte die Poly(A)⁺-RNA mit Hilfe einer ³²P-markierten Poly(dT)-Sonde detektiert werden (3.14.2). Während die als Negativkontrolle mitgeführte Mutante der RNA-Polymerase II, *rpb1-1*, eine um ca. 85 % reduzierte Konzentration an Poly(A)⁺-RNA aufwies, entsprach die mRNA-Menge der *npl3-27*-Mutante derjenigen des Wildtyps (Abb. 18D). Ein genereller Transkriptionsdefekt liegt folglich nicht vor. Zum anderen wurde sichergestellt, dass die *npl3-27*-Mutante weder einen Defekt bei der Synthese oder Prozessierung ribosomaler RNA (D. Sturm und H. Krebber, Marburg, persönliche Mitteilung) noch beim NMD-Prozess aufweist (I. J. Cajigas, C. I. González, San Juan/Puerto Rico und H. Krebber, Marburg, persönliche Mitteilung). Überdies pendelt *npl3-27p* auch bei 37 °C zwischen Kern und Zytoplasma, wie aus der nukleären Akkumulation des Proteins in verschiedenen mRNA-Exportmutanten ersichtlich wird (Abb. 8; Krebber *et al.*, 1999), und die *npl3-27*-Mutante zeigt keinen generellen mRNA-Exportdefekt (Krebber *et al.*, 1999).

Der Proteinsynthese-Defekt des *npl3-27*-Stammes beruht demnach möglicherweise in der Tat auf einem durch die verstärkte Polysomen-Assoziation von *npl3-27p* hervorgerufenen Translationsdefekt. In diesem Fall sollte er ebenso wie die verstärkte Polysomen-Assoziation (Abb. 17B) durch Überexpression von *Mtr10p* zu supprimieren sein. Daher wurden der *npl3-27*-Stamm HKY351 und der isogene Wildtyp-Stamm HKY352 simultan mit dem Reporterplasmid pHK358 (*P_{GALI}:NAB2-GFP*) und dem 2μ-Plasmid pHK13 (*MTR10*) oder dem leeren 2μ-Kontrollplasmid pHK68 transformiert. Die Zellen wurden in raffinosehaltigem Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen, für 30 min bei 37 °C inkubiert, induziert und verblieben weiterhin bei 37 °C. Unmittelbar vor (0 min) sowie 20, 40 und 80 min nach der Induktion wurde spektralphotometrisch die Zelldichte ermittelt, jeweils eine zu 10 ml einer OD₆₀₀ von 0,6 korrespondierende Zellmenge (= 6 OD) geerntet und in SDS-Probenpuffer aufgeschlossen. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung gleicher Lysat-Volumina erfolgte die Detektion der Nab2p-GFP-Moleküle mit einem Anti-GFP-Antikörper. Wie in Abb. 18E gezeigt, supprimierte die Überexpression von *Mtr10p* den Defekt in der Protein-Neusynthese vollständig.

Zusammengefasst zeigen die dargelegten Ergebnisse folgendes: (1) Der Stamm *npl3-27* weist einen Defekt in der Proteinsynthese auf, welcher mit einer starken Polysomen-Assoziation von *npl3-27p* korreliert; (2) der Proteinsynthese-Defekt des *npl3-27*-Stammes ist weder auf Transkriptionsdefekte noch auf generelle Defekte beim mRNA-Export, dem NMD-Prozess oder der rRNA-Synthese und -Prozessierung zurückzuführen.

5. DISKUSSION

Die Kompartimentierung der eukaryontischen Zelle und die damit verbundene Trennung von Nukleinsäure- und Proteinsynthese machen den Export von mRNA-Molekülen aus dem Zellkern unumgänglich. Der mRNA-Export ist ein äußerst komplexer Vorgang, an dem zahlreiche verschiedene Faktoren beteiligt sind, von denen bis heute lediglich ein Bruchteil identifiziert und genauer charakterisiert ist. Eine zentrale Rolle spielen die pendelnden mRNA-Bindeproteine, welche den Zellkern in Assoziation mit der mRNA verlassen und zu denen unter anderem das gut charakterisierte, SR-ähnliche Protein Npl3p aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zählt (Lee *et al.*, 1996; Krebber *et al.*, 1999; Gilbert und Guthrie, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei zu Npl3p homologe Proteine aus *S. cerevisiae*, Gbp2p (Lin und Zakian, 1994; Konkelt *et al.*, 1995; Pang *et al.*, 2003) und Hrb1p (Senger *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 1998), unter Einsatz diverser Methoden im Hinblick auf eine aktive bzw. passive Beteiligung am mRNA-Export und die Zugehörigkeit zur Familie der SR- und SR-ähnlichen Proteine untersucht. Zudem wurde der Frage nachgegangen, zu welchem Zeitpunkt die verschiedenen pendelnden mRNA-Bindeproteine im Zytoplasma von der mRNA dissoziieren und ob einige dieser Proteine möglicherweise den mRNA-Export mit der Translation koppeln. Im Zuge dessen konnten insbesondere auch neue Erkenntnisse über den Mechanismus der mRNA-Dissoziation von Npl3p gewonnen werden.

5.1 Gbp2p und Hrb1p sind als pendelnde mRNA-Bindeproteine am nukleären mRNA-Export beteiligt

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war Gbp2p ausschließlich in Zusammenhang mit Telomeren beschrieben worden. Gbp2p beeinflusst die Lokalisierung eines Telomer-assoziierten Proteins (Konkelt *et al.*, 1995), reguliert unter artifiziellen Bedingungen die Telomerlänge (Pang *et al.*, 2003) und erkennt *in vitro* die einzelsträngige Telomersequenz (TG₁₋₃)_n (Lin und Zakian, 1994). *In vivo* konnte eine Telomerbindung bislang allerdings nicht gezeigt werden. Da Gbp2p drei putative RNA-Erkennungsmotive (RRMs) besitzt (Abb. 5; Birney *et al.*, 1992), merkten Lin und Zakian (1994) an, dass seine Hauptfunktion möglicherweise nicht in der Bindung von einzelsträngiger DNA, sondern von RNA zu suchen ist. Zudem wurde das zu 47 % identische Protein Hrb1p als putatives, pendelndes RNA-Bindeprotein diskutiert (Senger *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 1998).

Mehrere in der vorliegenden Arbeit erhaltene Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei Gbp2p und Hrb1p um pendelnde, am mRNA-Export beteiligte mRNA-Bindeproteine handelt. So ist zunächst die Homologie zu dem mRNA-Exportfaktor Npl3p zu erwähnen.

Diese ist bemerkenswerterweise nicht allein auf die RRM's beschränkt, die zahlreiche RNA-Bindeproteine verschiedenster Organismen auszeichnen (Dreyfuss *et al.*, 1993). Vielmehr erstreckt sie sich auch auf die SR/RGG-reiche Domäne, welche für das nukleocytoplasmatische Pendeln von Npl3p von besonderer Bedeutung ist (Shen *et al.*, 1998; Yun und Fu, 2000; Gilbert *et al.*, 2001). In Npl3p befindet sich hier unter anderem das von dem Importrezeptor Mtr10p erkannte Kernlokalisierungssignal (NLS) (Senger *et al.*, 1998), und aufgrund der Homologie ist zu erklären, weshalb Gbp2p und Hrb1p den in Abb. 6C gezeigten Ergebnissen zufolge ebenfalls diesen Importrezeptor nutzen (5.3). Neben Gemeinsamkeiten zeichnen sich allerdings auch strukturelle Unterschiede zwischen den Proteinen ab. So ist die SR/RGG-reiche Domäne von Gbp2p und Hrb1p anders als bei Npl3p am Amino-terminus zu finden, und Gbp2p und Hrb1p weisen keine APQE-Domäne auf (Abb. 5). Die funktionelle Bedeutung der APQE-Domäne von Npl3p ist nicht bekannt.

Wie eine säulenchromatographische Isolierung von Gesamt-mRNA und eine anschließende immunologische Analyse der gebundenen Proteine ergaben, sind sowohl Gbp2p als auch Hrb1p *in vivo* mit mRNA assoziiert (Abb. 12). Der Isolierung ging eine kovalente Quervernetzung der Moleküle voraus, so dass eine indirekte Natur der mRNA-Assoziation nicht ausgeschlossen werden kann, doch aufgrund der RRM's ist eine direkte Bindung am wahrscheinlichsten. Gbp2p war im Gegensatz zu Hrb1p nur äußerst schwach im Eluat der Wildtyp-Zellen nachzuweisen. Da beide Proteine die mRNAs zu etwa gleichen Zeitpunkten binden und verlassen (5.1; 5.2), ist dies vermutlich nicht auf Unterschiede in der Länge, sondern in der Anzahl der mRNA-Bindungen zurückzuführen. Hrb1p würde demnach entweder insgesamt mehr mRNA-Moleküle erkennen oder pro mRNA-Molekül häufiger binden als Gbp2p. Häcker und Krebber (2004) bestätigten die mRNA-Bindung von Hrb1p-GFP in einem identisch durchgeführten Versuch. Shen *et al.* (1998) hingegen konnten Hrb1p-myc selbst bei starker Überexpression nicht im mRNA-Eluat detektieren, was unter Umständen mit der Verwendung eines anderen Fusionsproteins zu erklären ist. Interessanterweise liefern zwei kürzlich veröffentlichte Arbeiten Hinweise darauf, dass Gbp2p und Hrb1p mit Komponenten des an der Transkription und dem mRNA-Export beteiligten THO/TREX-Komplexes interagieren und von diesen im Verlauf der Transkriptionselongation auf die Prä-mRNAs transferiert werden (Häcker und Krebber, 2004; Hurt *et al.*, 2004). Im Gegensatz hierzu wird Npl3p zwar ebenfalls ko-transkriptionell, jedoch nicht von dem THO/TREX-Komplex, sondern vermutlich von der RNA-Polymerase II rekrutiert (Lei *et al.*, 2001; Häcker und Krebber, 2004; Hurt *et al.*, 2004).

Gbp2p und Hrb1p sind in einem Wildtyp-Stamm bei 25 °C vorrangig nukleär (Abb. 6A). Dies bedeutet entweder, dass die Proteine den Zellkern nicht verlassen können oder dass die Importrate die Exportrate übersteigt. Shen *et al.* (1998) wiesen ein nukleocytoplasmatisches Pendeln von Hrb1p nach, die Lokalisierung dieses Proteins repräsentiert

folglich einen dynamischen Zustand. Ähnliches trifft auch auf Gbp2p zu, wie unter Verwendung des Wildtyp-Proteins gezeigt werden konnte (Abb. 9). Um festzustellen, ob Gbp2p und Hrb1p den Zellkern in Assoziation mit mRNA verlassen, wurde nach Situationen gesucht, in denen die Proteine vorrangig zytoplasmatisch lokalisiert sind, der Import jedoch nicht vollständig unterbunden ist. Im Fall von Gbp2p ergab sich eine derartige Situation nach Austausch der in der SR/RGG-reichen Domäne befindlichen Serinreste 15 und 17 (Abb. 7B). Die zytoplasmatische Akkumulation ist hier entweder auf eine Verringerung der Importrate und/oder eine Erhöhung der Exportrate zurückzuführen (5.3). Der Eintritt in den Kern ist nicht vollständig verwehrt, da eine Überexpression von Mtr10p das mutierte Protein in den Zellkern zurückdrängt (Abb. 7C). Im Fall von Hrb1p konnte durch die starke Überexpression vermutlich eine Sättigung des Importrezeptors Mtr10p erzielt werden. Entsprechend ist das bei Überexpression vorrangig zytoplasmatische Hrb1p durch simultane Überexpression von Mtr10p in den Zellkern zu drängen (Häcker und Krebber, 2004). Interessanterweise sind Gbp2p und Npl3p im Gegensatz zu Hrb1p bei Überexpression von einem in hoher Kopienzahl vorliegenden 2μ -Plasmid und unter Kontrolle des starken *GALI*-Promotors nukleär (Abb. 10B). Da auch sie von Mtr10p importiert werden, deutet dies auf eine vergleichsweise geringe Affinität des Importrezeptors Mtr10p für Hrb1p hin. Die zytoplasmatischen Varianten von Gbp2p und Hrb1p rufen weder Wachstums- noch mRNA-Exportdefekte hervor (Abb. 10; Häcker und Krebber, 2004) und konnten daher für die Exportstudie verwendet werden.

Auch die zu Vergleichszwecken mitgeführte, bei 37 °C vorrangig zytoplasmatische Variante von Npl3p, npl3-27p, erzeugt keine mRNA-Exportdefekte (Krebber *et al.*, 1999). npl3-27p reflektiert exakt das Export-Verhalten des Wildtyp-Proteins (Lee *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999), da der Export von der RNA-Polymerase II-Transkription, der Arginin-Methyltransferase Hmt1p, den mRNA-Exportrezeptor-Komponenten Mex67p (Abb. 8) und Mtr2p (Abb. 8; Lei *et al.*, 2003) und dem Nukleoporein Rat7p (Abb. 8; Krebber *et al.*, 1999), nicht jedoch von der RNA-Helikase Dbp5p/Rat8p abhängt (Abb. 8).

Die mit Gbp2p und Hrb1p erhaltenen Ergebnisse geben Grund zu der Annahme, dass der Export beider Proteine ebenso wie derjenige von Npl3p eng mit dem Export von mRNA verknüpft ist. Zum einen verlassen Gbp2p und Hrb1p den Zellkern in Abhängigkeit von der RNA-Polymerase II-Transkription. Zum anderen akkumulieren sie im Zellkern von *rat7-1*- und *mex67-5*-Zellen (Abb. 8), welche bei der nicht-permissiven Temperatur von 37 °C einen starken und innerhalb weniger Minuten einsetzenden mRNA-Exportdefekt zeigen (Gorsch *et al.*, 1995; Segref *et al.*, 1997 und ohne Abb.).

Auch *mtr2-142*-Zellen weisen bei 37 °C einen derartigen mRNA-Exportdefekt auf (Lei *et al.*, 2003). Interessanterweise ist hier zwar der Export von Hrb1p und Npl3p, nicht jedoch der Export von Gbp2p blockiert (Abb. 8). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass

Gbp2p unter den vorliegenden Bedingungen von der mRNA dissoziiert und den Zellkern eigenständig verlässt. Möglicherweise handelt es sich bei dem Ergebnis jedoch auch um einen Hinweis darauf, dass Gbp2p-gebundene Transkripte den Zellkern zwar in Abhängigkeit von Mex67p, nicht jedoch von Mtr2p, verlassen. Dieser Theorie entsprechend würden Gbp2p-gebundene mRNAs eine separate Transkriptklasse darstellen, bei deren Export Mex67p seine Funktion entweder in Assoziation mit einem anderen Kofaktor oder alleine ausübt. Für letzteres spricht, dass Mex67p auch unabhängig von Mtr2p *in vitro* an mRNA (Santos-Rosa *et al.*, 1998) und verschiedene Nukleoporine (Strawn *et al.*, 2001) bindet und in *mtr2-142*-Zellen nur teilweise misslokalisiert ist (Lei *et al.*, 2003). Berichte, nach denen Gbp2p und Npl3p direkt (Inoue *et al.*, 2000) bzw. indirekt (Hurt *et al.*, 2004) interagieren, sind angesichts unterschiedlicher Exportbedingungen so zu interpretieren, dass diese Interaktionen vor oder nach, jedoch nicht während des Exportprozesses stattfinden.

In *rat8-1*-Zellen akkumuliert mRNA bereits bei 23 °C und in verstärktem Maße bei 37 °C im Zellkern (Snay-Hodge *et al.*, 1998). Auch hier zeigt sich ein interessanter Unterschied zwischen den drei pendelnden Proteinen, da lediglich der nukleäre Export von Hrb1p blockiert ist (Abb. 8). Dies könnte darauf hindeuten, dass die RNA-Helikase Dbp5p/Rat8p nicht am Export aller mRNAs beteiligt ist und zeigt ebenfalls unterschiedliche Exportbedingungen für Gbp2p-, Hrb1p- und Npl3p-gebundene Transkripte auf.

Zahlreiche Prä-mRNA- und mRNA-bindende Proteine unterliegen einer Argininmethylierung (Liu und Dreyfuss, 1995). Die in *S. cerevisiae* vorherrschende Arginin-Methyltransferase Hmt1p modifiziert Npl3p, Hrp1p und Nab2p an RGG-Motiven und fördert den Export dieser Proteine (Shen *et al.*, 1998; Green *et al.*, 2002). Gbp2p und Hrb1p besitzen ebenfalls mehrere RGG-Motive in der SR-ähnlichen Domäne, und für Hrb1p wurde unter *in vitro*-Bedingungen eine Methylierung durch Hmt1p nachgewiesen (Shen *et al.*, 1998). Tatsächlich akkumuliert Hrb1p in geringem Maße im Zellkern der Hmt1p-Mutante (Abb. 8), was entgegen einem früheren Bericht von Shen *et al.* (1998) auf einen schwachen Einfluss der Methylierung auf die Exportrate schließen lässt. Der Export von Gbp2p wird durch die *HMT1*-Deletion hingegen nicht beeinträchtigt (Abb. 8). Ob es sich bei Gbp2p dennoch um ein Substrat von Hmt1p oder einer anderen Arginin-Methyltransferase handelt, bleibt zu klären.

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse der Exportstudie vermuten, dass Gbp2p und Hrb1p den Zellkern in Assoziation mit mRNA verlassen und stützen die Hypothese, dass mehrere parallele, unterschiedlich regulierte mRNA-Exportwege existieren (Saavedra *et al.*, 1997; Krebber *et al.*, 1999; Duncan *et al.*, 2000; Farago *et al.*, 2003; Hieronymus und Silver, 2003).

Ein weiteres Indiz für eine Beteiligung von Gbp2p am mRNA-Export ist der mRNA-Exportdefekt von Wildtyp-Zellen bei Überexpression des Proteins (Abb. 10). Auf den

ersten Blick spricht das Ergebnis für eine negativ regulatorische Funktion von Gbp2p, doch dies ist aufgrund der positiven Kopplung des Gbp2p- und mRNA-Exports (Abb. 8) unwahrscheinlich. Vielmehr ist der mRNA-Exportdefekt möglicherweise auf eine Verdrängung oder Beschlagnahme essentieller mRNA-Exportfaktoren durch das im Überschuss vorhandene Gbp2p zurückzuführen. Für Hrb1p ist über eine Toxizität nicht direkt zu entscheiden, da diese wie bei Npl3p (Flach *et al.*, 1994) mit einer nukleären Lokalisierung des Proteins gekoppelt sein könnte, Hrb1p bei starker Überexpression jedoch vorrangig zytoplasmatisch ist (Abb. 10B).

Ob die Beteiligung von Gbp2p und Hrb1p am nukleären mRNA-Export aktiver oder passiver Natur ist, bleibt zu klären. Sicher hingegen ist, dass beide Proteine trotz der Homologie nicht in der Lage sind, Npl3p funktionell zu ersetzen. Vielmehr wird das Wachstum der *npl3-1*-Mutante durch eine leichte Überexpression von Gbp2p beeinträchtigt, und zwar in weitaus stärkerem Maße als dasjenige des Wildtyps (Abb. 11). *npl3-1p* weist einen einzelnen Aminosäure-Austausch auf, welcher in der RRM2-Domäne lokalisiert ist (A254V) (Lee *et al.*, 1996) und unter Umständen die RNA-Bindung des Proteins schwächt. Eventuell löst oder verdrängt überexprimiertes Gbp2p diese Npl3p-Variante daher leicht von der mRNA. *GBP2* und *HRB1* sind nicht essentiell (4.4; Konkel *et al.*, 1995; Shen *et al.*, 1998) und auch eine *GBP2-HRB1*-Doppeldeletionsmutante zeigt unter Standardbedingungen weder ein drastisch verlangsamtes Wachstum noch einen generellen mRNA-Exportdefekt (A. Kurz und H. Krebber, Marburg, persönliche Mitteilung; Hurt *et al.*, 2004). Möglicherweise sind Gbp2p und Hrb1p daher unter Standardbedingungen funktionell durch andere Proteine zu ersetzen oder sie sind ausschließlich am Export nicht-essentieller mRNAs beteiligt. Verschiedene Stressfaktoren, beispielsweise ein stark alkalischer pH-Wert oder eine hohe Lithiumchlorid-Konzentration des Mediums, sind für die *GBP2-HRB1*-Deletionsmutante, nicht jedoch für die Einzelmutanten, hingegen interessanterweise lethal (A. Kurz und H. Krebber, Marburg, persönliche Mitteilung). Gbp2p und Hrb1p besitzen demnach redundante Funktionen und haben das Potential, den mRNA-Export unter spezifischen Bedingungen fundamental zu regulieren. Eventuell erkennen sie bevorzugt stressinduzierte mRNA-Moleküle. Demgegenüber ist Npl3p definitiv nicht in den Export stressinduzierter mRNAs involviert, da es unter diversen Stressbedingungen vollständig von der mRNA dissoziiert (Krebber *et al.*, 1999).

5.2 Erfüllen verschiedenste pendelnde mRNA-Bindeproteine Funktionen bei der Translation?

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, konnten Gbp2p und Hrb1p neben dem Exportrezeptor Mex67p-Mtr2p, den Kappenproteinen Cbp80p und Cbp20p, dem Poly(A)-

Bindeprotein Pab1p, der RNA-Helikase Dbp5p, Npl3p, Hrp1p und Nab2p in die Reihe der pendelnden mRNA-Bindeproteine aus *S. cerevisiae* eingegliedert werden. In einer umfassenden und vergleichenden Polysomen-Kosedimentations-Studie wurde daraufhin ermittelt, zu welchem Zeitpunkt die pendelnden Proteine im Zytoplasma von der mRNA dissoziieren. Hierbei zeigten sich auffällige Unterschiede.

Cbp80p und Hrp1p waren lediglich in äußerst geringer Menge in den ribosomalen Fraktionen zu detektieren (Abb. 13). Dies stimmt mit dem aktuellen Translations- und NMD-Modell überein, demzufolge ausschließlich die Pionerrunde, in der die Ribosomen das als Signalprotein am NMD-Prozess beteiligte Hrp1p entfernen (González *et al.*, 2000), in CBC-gebundenem Zustand stattfindet (Ishigaki *et al.*, 2001; Lejeune *et al.*, 2002). Der CBC-Komplex wird direkt im Anschluss durch den eIF 4F-Komplex ersetzt, welcher den eigentlichen Translationsvorgang initiiert und reguliert und durch Interaktion mit Pab1p einen Ringschluss der mRNA herbeiführt (Gingras *et al.*, 1999). In der Tat liefen 37 % der Pab1p-Moleküle bis weit in die polysomalen Fraktionen ein (Abb. 13). Ein derartiges Kosedimentations-Verhalten von Pab1p wurde bereits an anderer Stelle beschrieben (Anderson *et al.*, 1993; Horton *et al.*, 2001).

Deutlich weniger ist über den zytoplasmatischen Verbleib bzw. etwaige zytoplasmatische Funktionen der anderen pendelnden mRNA-Bindeproteine bekannt. Nab2p war zu lediglich 4 % in den polysomalen Fraktionen zu detektieren (Abb. 13) und dissoziiert daher möglicherweise bereits zu einem frühen Zeitpunkt von den Transkripten. Allerdings ist auch nicht auszuschließen, dass die Polysomen-Assoziation des Proteins zu labil ist, um unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nachgewiesen werden zu können. Mex67p kosedimentiert zu 15 % mit Polysomen (Abb. 13). In dem Zusammenhang ist interessant, dass das homologe Protein aus Mammaliazellen, Tap, durch seine Bindung die Translation ungespleißter mRNA-Moleküle fördert (Jin *et al.*, 2003).

Gbp2p, Hrb1p und Npl3p sind bemerkenswerterweise zu einem signifikant hohen Anteil von ca. 30 % mit translatierenden mRNPs assoziiert, Dbp5p sogar zu ca. 50 % (Abb. 13). Alle vier Proteine binden die mRNAs mit großer Wahrscheinlichkeit in der kodierenden Region (Lei *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2002; Hurt *et al.*, 2004). Vermutlich ist die mRNA-Dissoziation dennoch nicht - oder nicht alleinig - Ribosomen-induziert, da ansonsten eine ähnlich frühe Ablösung wie für Hrp1p erwartet würde. Vielmehr scheinen die Proteine während der Ribosomenpassage entweder weiterhin an die mRNA zu binden oder aber direkt nach der Ribosomenpassage erneut zu binden. Aufgrund der signifikanten und langandauernden Polysomen-Assoziation ist eine direkte, aktive Beteiligung von Gbp2p, Hrb1p, Npl3p und Dbp5p am Translationsprozess denkbar. Wie mit Hilfe der *npl3-27*-Mutante gezeigt werden konnte, inhibiert eine verlängerte Polysomen-Assoziation von Npl3p aller Wahrscheinlichkeit nach den Translationsprozess (Abb. 17 und 18). Dies

erlaubt Spekulationen darüber, ob es sich bei der zeitgenauen Dissoziation von Npl3p um einen Mechanismus handelt, über den die Zelle ihre Translationsaktivität reguliert. Ein derartiges Modell wird auch dadurch gestützt, dass die *npl3-27*-Mutation den Wachstumsdefekt der Zellen in Gegenwart von Translationselongations-Inhibitoren wie Cycloheximid oder Paromomycin supprimiert (H. Krebber, Marburg, persönliche Mitteilung). In diesen Situationen entspannt die generell erniedrigte Translationsgeschwindigkeit unter Umständen die Lage und ermöglicht so die Entstehung korrekter Polypeptide.

In Analogie zu den hier präsentierten Ergebnissen wurde kürzlich eine Polysomen-Assoziation für das pendelnde SR-Protein SF2/ASF aus Mammaliazellen nachgewiesen (Sanford *et al.*, 2004). Die Autoren zeigten ferner, dass SF2/ASF die Translation von Reportertranskripten fördert, wenn es artifiziell daran gebunden oder überexprimiert wird. Zum einen erhärtet dies die hier aufgestellte Vermutung, dass pendelnde SR-Proteine den Translationsprozess beeinflussen. Zum anderen verdeutlicht es, dass diese Beeinflussung abhängig vom jeweiligen SR-Protein positiver oder negativer Natur sein kann. Ein weiteres pendelndes SR-Protein aus Mammaliazellen, SRp20, scheint hingegen überhaupt nicht an der Translation beteiligt zu sein, denn es ist nur äußerst schwach mit Mono- bzw. Polysomen assoziiert (Sanford *et al.*, 2004). Die pendelnden SR-Proteine agieren in Bezug auf die Translation demnach unterschiedlich, und es wird sehr aufschlussreich sein, diese Diversität und die jeweiligen Funktionen genauer zu beleuchten.

5.3 Faktoren für die nukleäre Lokalisierung von Gbp2p, Hrb1p und Npl3p

Gbp2p und Hrb1p pendeln zwischen Zellkern und Zytoplasma, und da die Importrate die Exportrate übersteigt, sind beide Proteine in einem Wildtyp-Stamm vorrangig nukleär (Abb. 6A). Sowohl bei Gbp2p als auch bei Hrb1p hängt die nukleäre Lokalisierung maßgeblich von dem Karyopherin Mtr10p ab (Abb. 6C). Andere Karyopherine, wie beispielsweise der Importrezeptor der pendelnden mRNA-Bindeproteine Hrp1p und Nab2p, Kap104p (Lee und Aitchison, 1999), oder Pse1p und Kap123p, welche vorwiegend ribosomale Proteine und Histone importieren (Rout *et al.*, 1997; Mosammaparast *et al.*, 2002), beeinflussen die Lokalisierung der Proteine hingegen nicht. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei Mtr10p um den Importrezeptor von Gbp2p und Hrb1p handelt. Interessanterweise konnte Hrb1p *in vivo* bereits in einem Komplex mit Mtr10p gereinigt werden (Senger *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde mehrmals versucht, auch die Bindung von Gbp2p und Mtr10p mittels Ko-Immunopräzipitation zu bestätigen. Zwar gelang die Reproduktion des Nachweises der Npl3p-Mtr10p-Bindung (Senger *et al.*, 1998; Yun und Fu, 2000; Gilbert *et al.*, 2001), doch der direkte Nachweis einer Gbp2p-Mtr10p-

Bindung war auf diese Weise nicht möglich (ohne Abb.). Vermutlich binden deutlich weniger Gbp2p- als Npl3p-Moleküle an Mtr10p, oder die Interaktion ist sehr kurz oder schwach und damit experimentell schwer zu zeigen. Npl3p, bei welchem es sich um das einzige bereits zuvor beschriebene Substrat von Mtr10p handelt, wird von Mtr10p an einer zwischen den Aminosäuren 283 und 414 und somit innerhalb der RS-ähnlichen Domäne gelegenen NLS-Sequenz erkannt und gebunden (Pemberton *et al.*, 1997; Senger *et al.*, 1998). Vor diesem Hintergrund ist anzunehmen, dass sich die NLS-Sequenzen von Gbp2p und Hrb1p ebenfalls in den RS-ähnlichen Domänen befinden. Wie im Fall von Gbp2p gezeigt werden konnte, ist die RS-ähnliche Domäne für die nukleäre Lokalisierung des Proteins in der Tat von essentieller Bedeutung (Abb. 7B).

Die nukleäre Lokalisierung von Gbp2p und Hrb1p hängt überdies von der zytoplasmatischen SR-Proteinkinase Sky1p ab (Abb. 7A). Die direkteste Erklärung hierfür ist, dass es sich bei Gbp2p und Hrb1p um Sky1p-Substrate handelt, zumal beide Proteine mehrere SR/RS-Dipeptide und somit potentielle Phosphorylierungsstellen aufweisen. Die Tatsache, dass eine Mutation von zwei der drei wahrscheinlichsten Sky1p-Phosphorylierungsstellen von Gbp2p, S15 und S17, ebenfalls zu einer zytoplasmatischen Misslokalisierung führt (Abb. 7B), stützt diese Theorie. Die Misslokalisierung von gbp2(S13,15,17A)p, gbp2(S15A)p und gbp2(S17A)p könnte allerdings auch ganz Phosphorylierungs-unabhängig auf einen Defekt in der Erkennung durch Mtr10p zurückgehen, da sich die mutierten Serinreste in der putativen NLS-Sequenz befinden. Ein derartiger Defekt scheint jedoch nicht vorzuliegen, denn wie in Abb. 12B gezeigt, verhält sich gbp2(S13,15,17A)p in Bezug auf die Stärke der mRNA-Bindung nicht wie Gbp2p in *mtr10::HIS3*-Zellen, sondern vielmehr exakt wie Gbp2p in *sky1::TRP1*-Zellen. Die Serinreste 15 und 17 von Gbp2p sind somit potentielle Sky1p-Phosphorylierungsstellen, wobei eine Phosphorylierung an weiteren Positionen nicht auszuschließen ist.

Alle Mitglieder der SRPK-Familie inklusive Sky1p zeichnen sich durch eine sehr hohe Substratspezifität aus und phosphorylieren die Serinreste der Konsensussequenz RSRSRSR, welche die RS-Domänen von Mammaliaproteinen charakterisiert. Wie Nolen *et al.* (2001) aufgrund strukturanalytischer Daten postulierten, geschieht die Phosphorylierung dieser Sequenz sequentiell, und zwar im Anschluss an eine initiale Phosphorylierung des ersten Serinrestes. Die initiale Phosphorylierung muss angesichts der Bindespezifität der SRPKs entweder sehr langsam verlaufen oder von anderen Kinasen vorgenommen werden, und der phosphorylierte Serinrest dient daraufhin als Nukleophil für den folgenden Phosphotransfer. Da die Aminosäurereste 12 bis 17 von Gbp2p der Konsensussequenz nahezu perfekt entsprechen (RSRSRS), überrascht es, dass der Serinrest 13 keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisierung von Gbp2p hat. Offensichtlich wird die initiale Phosphorylierung erst an dem Serinrest 15 vorgenommen. Bei dem bislang einzigen beschriebenen

Sky1p-Substrat aus *S. cerevisiae* handelt es sich um Npl3p, welches ausschließlich an dem Serinrest 411 phosphoryliert wird (Yun und Fu, 2000; Gilbert *et al.*, 2001). Bei einem Vergleich der Sky1p-Phosphorylierungssequenzen von Gbp2p und Npl3p zeigt sich ein interessanter Unterschied (Abb. 19): Npl3p besitzt an der Position -2 einen Glutaminsäurerest, welcher für die Phosphorylierung essentiell ist (Yun und Fu, 2000; Nolen *et al.*, 2001) und vermutlich in Analogie zu einem ständig phosphorylierten Serinrest fungiert. Im Gegensatz zu Gbp2p ist Npl3p somit nicht auf eine initiale Phosphorylierung angewiesen, und die konstitutiv aktive Kinase Sky1p (Nolen *et al.*, 2001) kann Npl3p jederzeit modifizieren. Bei Gbp2p hingegen könnte die initiale Phosphorylierung den Zeitpunkt und/oder Ort der Sky1p-Phosphorylierung festlegen und somit einen Beitrag zur Regulation der intrazellulären Lokalisierung bzw. des nukleo-zytoplasmatischen Pendelns leisten.

| | -3 | -2 | -1 | 0 | +1 | +2 | +3 |
|-----------|----|----|----|---|----|----|----|
| Gbp2p | R | S | R | S | P | V | R |
| Npl3p | R | E | R | S | P | T | R |
| RS-Domäne | R | S | R | S | R | S | R |

Abb. 19. Vergleich der SRPK-Phosphorylierungssequenzen von Gbp2p, Npl3p und den SR-Proteinen aus Mammaliazellen. SRPK-Kinasen benötigen einen phosphorylierten Serinrest an der Position -2, um den Serinrest an Position 0 effizient phosphorylieren zu können. Diese initiale Phosphorylierung wird möglicherweise von anderen Kinasen vorgenommen. Npl3p besitzt an Position -2 einen Glutaminsäurerest, welcher vermutlich in Analogie zu einem ständig phosphorylierten Serinrest fungiert, und kann im Gegensatz zu Gbp2p daher jederzeit von der SRPK-Kinase Sky1p modifiziert werden.

Gbp2p und Hrb1p sind aufgrund des Besitzes mehrerer RRM's und einer SR-reichen Domäne strukturell homolog zu dem SR-ähnlichen Protein Npl3p und den SR-Proteinen aus Mammaliazellen. Die Tatsache, dass beide Proteine in ihrer nukleären Lokalisierung von Mtr10p und Sky1p abhängen, ist ein weiterer deutlicher Hinweis auf eine Zugehörigkeit zur Familie der SR- und SR-ähnlichen Proteine. So ist Mtr10p das *S. cerevisiae*-Homolog des SR-spezifischen Importrezeptors Transportin-SR (Senger *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 2001), und Sky1p zählt zu den SRPK-Kinasen, welche die intrazelluläre Lokalisierung der SR-Proteine regulieren (Koizumi *et al.*, 1999; Siebel *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte folglich gezeigt werden, dass in *S. cerevisiae* eine ganze Gruppe SR-ähnlicher Proteine existiert, deren bislang identifizierte Mitglieder alle in den nukleären mRNA-Export involviert sind.

Weshalb führt eine Inhibierung der Sky1p-Phosphorylierung nun zu einer zytoplasmatischen Misslokalisierung von Gbp2p und Hrb1p? Diesbezüglich gibt es mehrere Möglichkeiten: 1) Die Phosphorylierung beschleunigt den Kernimport der Proteine, indem sie beispielsweise die mRNA-Dissoziation und/oder die Bindung an Mtr10p erleichtert; 2) die Phosphorylierung verlangsamt den Kernexport; 3) Beschleunigung des Kernimports und Verlangsamung des Kernexports in Kombination. Obwohl eine Verlangsamung des

Kernexports generell nicht auszuschließen ist, liegt insbesondere eine Beschleunigung des Kernimports und damit eine zytoplasmatische Funktion der Gbp2p- und Hrb1p-Phosphorylierung nahe, da es sich bei Sky1p um ein zytoplasmatisches Enzym handelt (Siebel *et al.*, 1999), welches bei nukleärer Lokalisierung toxisch ist (Gilbert und Guthrie, 2004). Wie mit Hilfe der Saccharose-Dichtegradienten gezeigt werden konnte, hat Sky1p keinen Einfluss auf die Länge der Polysomen-Assoziation von Gbp2p (Abb. 15). Im Fall von Gbp2p ist somit nicht von einer Phosphorylierungs-induzierten mRNA-Dissoziation auszugehen. Der Importrezeptor Mtr10p hingegen ist vermutlich an der mRNA-Dissoziation von Gbp2p und Hrb1p beteiligt, denn die mRNA-Bindung beider Proteine ist in *mtr10::HIS3*-Zellen signifikant verstärkt (Abb. 12; Häcker und Krebber, 2004). Interessanterweise verstärkt auch eine Inhibierung der Sky1p-Phosphorylierung die mRNA-Bindung von Gbp2p in geringem Maße (Abb. 12B). Unter Umständen ist dies auf eine unspezifische Bindung an verschiedenste RNA-Moleküle zurückzuführen. So zeigten Xiao und Manley (1997) und Tacke *et al.* (1997), dass die Phosphorylierung von RS-Domänen eine unspezifische Bindung der ansonsten stark positiv geladenen SR-Proteine an RNA inhibiert. Obwohl die unspezifischen Bindungen aufgrund der vorrangig zytoplasmatischen Lokalisierung von Gbp2p in *SKY1*-Deletionszellen (Abb. 7A) größtenteils im Zytoplasma stattfinden müssen, werden sie in den Dichtegradienten nicht detektiert. Möglicherweise sind sie zu schwach, um während einer experimentellen Aufarbeitung erhalten zu bleiben, sofern nicht zuvor eine Quervernetzung der Moleküle stattgefunden hat. Dem oben beschriebenen Modell zufolge bindet Gbp2p die nukleären mRNA-Moleküle unter Wildtyp-Bedingungen im phosphorylierten Zustand. Ähnliches wurde kürzlich auch für Npl3p postuliert (Gilbert und Guthrie, 2004). Dass unspezifische Bindungen an gerade den Zellkern verlassende RNPs den Kernexport nicht-phosphorylierter Gbp2p-Moleküle beschleunigen, ist zwar denkbar, allerdings relativ unwahrscheinlich. Denn auch bei Npl3p werden durch die Phosphorylierung vermutlich unspezifische RNA-Bindungen verhindert (siehe unten), doch nicht-phosphoryliertes npl3-27p reflektiert exakt das Exportverhalten des Wildtyp-Proteins (5.1). Daher resultiert die zytoplasmatische Misslokalisierung nicht-phosphorylierter Gbp2p-Moleküle unter Umständen in erster Linie aus einer erschwerten Bindung an Mtr10p. Hierfür spricht auch, dass gbp2(S13,15,17A)p durch eine Überexpression von Mtr10p in den Zellkern zurückzudrängen ist (Abb. 7C). In der Tat wird die Importrezeptor-Bindung zahlreicher Proteine, beispielsweise diejenige der SR-Proteine aus Mammaliazellen oder des Transkriptionsfaktors Swi6p aus *S. cerevisiae*, direkt durch eine Phosphorylierung innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der NLS-Sequenz reguliert (Lai *et al.*, 2001; Harreman *et al.*, 2004). Da Sky1p nicht an der mRNA-Dissoziation beteiligt ist, kann das Enzym die Gbp2p-Mtr10p-Bindung allerdings erst im Anschluss an die Mtr10p-induzierte mRNA-Dissoziation von Gbp2p fördern. Denkbar wäre beispielsweise

eine Phosphorylierungs-induzierte Konformationsänderung des Gbp2p-Moleküls, welche die Gbp2p-Mtr10p-Bindung im Nachhinein festigt (siehe auch 5.4). Weshalb eine Deletion von *SKY1* die intrazelluläre Lokalisierung von Hrb1p deutlich schwächer beeinflusst als diejenige von Gbp2p (Abb. 7A), ist nicht klar. Möglicherweise sind für die Misslokalisierung von Hrb1p andere Gründe verantwortlich, oder die Phosphorylierung fördert die Hrb1p-Mtr10p-Bindung in vergleichsweise geringem Maße.

Die präsentierten Dichtegradienten-Ergebnisse geben auch der Diskussion um den Mechanismus der mRNA-Dissoziation von Npl3p eine neue Wendung. Nach aktuellem Modell sind sowohl Mtr10p als auch die Sky1p-vermittelte Phosphorylierung direkt und teilweise unabhängig voneinander an der mRNA-Dissoziation von Npl3p beteiligt (Gilbert *et al.*, 2001). Dieses Modell beruht darauf, dass 1) Npl3p in einer *MTR10*- und einer *SKY1*-Deletionsmutante verstärkt an die Gesamt-mRNA bindet und zugleich im Zytoplasma akkumuliert (Abb. 12 und 17A; Gilbert *et al.*, 2001), 2) nicht-phosphoryliertes Npl3p in einer *MTR10*-Deletionsmutante stärker an die Gesamt-mRNA bindet als das Wildtyp-Protein (Gilbert *et al.*, 2001) und 3) die Npl3p-Mtr10p-Bindung in einer *SKY1*-Deletionsmutante reduziert ist (Yun und Fu, 2000; Gilbert *et al.*, 2001). Die Beteiligung von Sky1p an der mRNA-Dissoziation ist allerdings umstritten, da auch phosphoryliertes Npl3p an mRNA binden kann bzw. sogar Hinweise darauf vorliegen, dass Npl3p die nukleären mRNAs unter Wildtyp-Bedingungen im phosphorylierten Zustand bindet (Abb. 4; Gilbert und Guthrie, 2004; Izaurralde, 2004). Die Dichtegradienten-Ergebnisse lassen nun vermuten, dass zwar Mtr10p (Abb. 16A und 17B), nicht jedoch Sky1p (Abb. 15) an der Ablösung von Npl3p von aktiv translatierenden mRNPs beteiligt ist (Abb. 20). Die Dissoziation von mRNA-Bindeproteinen im Zytoplasma trägt entscheidend zur Direktionalität der mRNA-Exportprozesse bei (Erkmann und Kutay, 2004; Izaurralde, 2004). Mtr10p kann allerdings auch ohne Beihilfe der zytoplasmatischen Kinase Sky1p Direktionalität verleihen, da es als Mitglied der Karyopherin-Familie seine Importsubstrate ausschließlich im RanGTP-armen Milieu des Zytoplasmas bindet (vgl. Abb. 2; Görlich *et al.*, 1997). Interessanterweise ist für die Dissoziation des Npl3p-Mtr10p-Komplexes im Zellkern neben RanGTP auch RNA erforderlich (Senger *et al.*, 1998), die Dissoziation im Zellkern bildet somit den exakten Gegenpol zur Mtr10p-induzierten mRNA-Dissoziation von Npl3p im Zytoplasma. Möglicherweise ist aus sterischen Gründen eine simultane Bindung von Mtr10p und mRNA an Npl3p ausgeschlossen. Denkbar wäre in dem Zusammenhang auch, dass Mtr10p nicht direkt an der mRNA-Dissoziation von Npl3p beteiligt ist, sondern in erster Linie die erneute RNA-Bindung des Proteins verhindert, nachdem dieses durch die Passage translatierender Ribosomen abgelöst wurde. Tatsächlich kosedimentiert Mtr10p lediglich in äußerst geringen Mengen mit aktiven Translationskomplexen (Abb. 13), doch eventuell ist die Interaktion sehr kurz oder instabil und damit schwer nachzuweisen.

Angesichts der neuen Erkenntnis über die mRNA-Dissoziation von Npl3p sind die zur Beziehung zwischen Npl3p und Sky1p vorliegenden Daten zu re-interpretieren. Vermutlich resultiert die verstärkte mRNA-Bindung von Npl3p in einer *SKY1*-Deletionsmutante - ebenso wie bereits für Gbp2p diskutiert - aus einer unspezifischen und ohne Quervernetzung der Moleküle nicht nachzuweisenden Bindung des hypophosphorylierten Proteins an diverse RNAs. Doch welche über die Verhinderung unspezifischer RNA-Bindungen hinausgehende Rolle spielt die Sky1p-vermittelte Phosphorylierung im Pendelzyklus von Npl3p? Einen Hinweis hierauf liefern möglicherweise die postulierte Funktion der nukleären Dephosphorylierung und die reduzierte Npl3p-Mtr10p-Bindung in der *SKY1*-Deletionsmutante (Gilbert *et al.*, 2001). Wie bereits erwähnt, bindet das als mRNA-Exportadapter fungierende Npl3p die nukleären mRNAs dem aktuellen Modell zufolge im phosphorylierten Zustand. Eine Dephosphorylierung durch die nukleäre Phosphatase Glc7p bewirkt daraufhin die Rekrutierung des mRNA-Exportrezeptors Mex67p (Gilbert

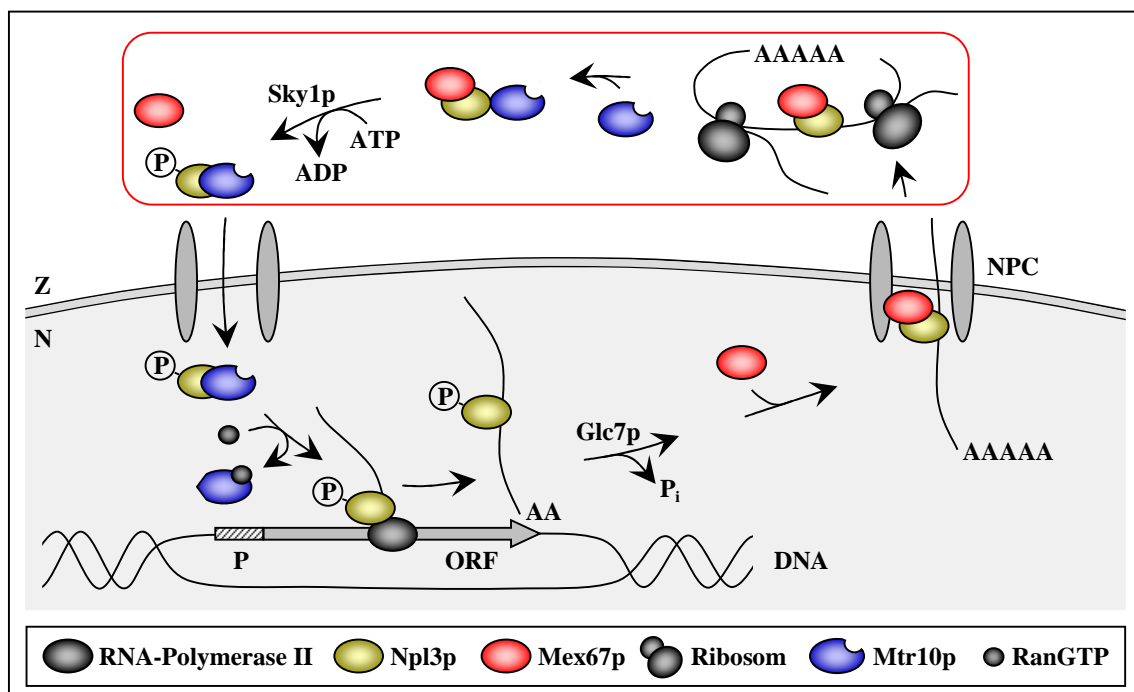


Abb. 20. Neues Modell des Funktionszyklus von Npl3p. Npl3p bindet die entstehenden Transkripte im phosphorylierten Zustand. Die Dephosphorylierung des Moleküls durch die nukleäre Phosphatase Glc7p führt daraufhin zur Rekrutierung des Exportrezeptors Mex67p. Nach der Translokation verbleibt Npl3p zunächst auf der mRNA und wird im Verlauf der Translation von dem Importrezeptor Mtr10p und möglicherweise unter Mitwirkung der Ribosomen abgelöst. Die Sky1p-vermittelte, zytoplasmatische Phosphorylierung von Npl3p ist nicht am mRNA-Dissoziationsprozess beteiligt, sondern bewirkt als Gegenpol zur nukleären Dephosphorylierung die Ablösung von Mex67p. Dieser Vorgang festigt die Npl3p-Mtr10p-Bindung. Im Zellkern zerfällt der Npl3p-Mtr10p-Komplex in Gegenwart von RanGTP und RNA. Der Übersichtlichkeit halber wurden weitere mRNA-Bindeproteine sowie die nukleäre Methylierung von Npl3p, welche den Export des Proteins aus unbekannten Gründen fördert, nicht dargestellt. Die Änderungen zum bisherigen Modell (Abb. 4) sind rot umrandet. A: Adenosin; N: Nukleoplasma; ORF: offener Leserahmen; P: Promotor; (P): Phosphatrest; P_i: anorganisches Phosphat; Z: Zytoplasma

und Guthrie, 2004). Möglicherweise geschieht im Zytoplasma Gegenteiliges: nach der Mtr10p-vermittelten mRNA-Dissoziation des Npl3p-Mex67p-Komplexes induziert die Phosphorylierung die Ablösung von Mex67p (Izaurrealde, 2004) und stabilisiert so die Npl3p-Mtr10p-Bindung (Abb. 20). Dieses Modell wird auch dadurch gestützt, dass in *in vitro*-Studien mit gereinigten Mtr10p- und Npl3p-Molekülen kein signifikanter Einfluss der Phosphorylierung auf die Npl3p-Mtr10p-Bindung beobachtet werden konnte (Yun und Fu, 2000; Gilbert *et al.*, 2001). Die Polysomen-Kosedimentations-Ergebnisse widersprechen einer simultanen mRNA-Dissoziation von Mex67p und Npl3p nicht. Zwar ist Mex67p zu einem geringeren Prozentsatz mit Polysomen assoziiert als Npl3p, doch zum einen handelt es sich bei Npl3p nicht um den einzigen Adapter für Mex67p (Sträßer und Hurt, 2000), und zum anderen laufen einige Mex67p-Moleküle relativ weit in die polysomalen Fraktionen ein (Abb. 13).

Phosphorylierungen können sowohl die Protein- als auch die RNA-Interaktionen von SR-Proteinen beeinflussen (Tacke *et al.*, 1997; Xiao und Manley, 1997; Yun *et al.*, 2003), und es wird interessant sein, näher zu untersuchen, inwieweit die Sky1p-vermittelte Phosphorylierung die Protein- und RNA-Interaktionen von Npl3p, Gbp2p und Hrb1p modifiziert.

5.4 Modelle der Funktionszyklen von Gbp2p und Hrb1p

Zusammenfassend lässt sich folgendes Modell für den Funktionszyklus von Gbp2p aufstellen (Abb. 21): Gbp2p wird im phosphorylierten Zustand durch Interaktion mit dem THO/TREX-Komplex auf spezielle und möglicherweise insbesondere auf stressinduzierte Transkripte geladen. Dieselben Transkripte werden auch von Mex67p, nicht aber von Mtr2p, Dbp5p, Hrb1p und Npl3p gebunden. Nach der RNA-Bindung findet eine Dephosphorylierung von Gbp2p durch die nukleäre Phosphatase Glc7p statt. Eventuell initiiert dieser Schritt ähnlich wie bei Npl3p die Assoziation eines weiteren Moleküls oder mehrerer Moleküle und trägt so zur Entstehung Export-kompetenter mRNPs bei. Die Identität der potentiellen Gbp2p-Interaktionspartner ist nicht klar, doch da Npl3p und die pendelnden SR-Proteine aus Mammaliazellen als mRNA-Exportadapter fungieren (Huang *et al.*, 2003; Gilbert und Guthrie, 2004), ist der mRNA-Exportrezeptor Mex67p besonders naheliegend. Nach neuesten Erkenntnissen leitet interessanterweise auch bei den pendelnden SR-Proteinen ASF/SF2 und 9G8 aus Mammaliazellen eine auf die Prä-mRNA-Bindung folgende Dephosphorylierung die Rekrutierung des mRNA-Exportrezeptors TAP ein (Huang *et al.*, 2004; Lai und Tarn, 2004). Sollte Gbp2p die Funktion eines mRNA-Exportadapters erfüllen, so wäre die Tatsache, dass Gbp2p nicht in der Lage ist, Npl3p funktionell zu ersetzen, auf die postulierten unterschiedlichen mRNA-Bindeszifitäten beider Proteine zurückzuführen. Im Zytoplasma wird Gbp2p erst im Verlauf der Translation von den

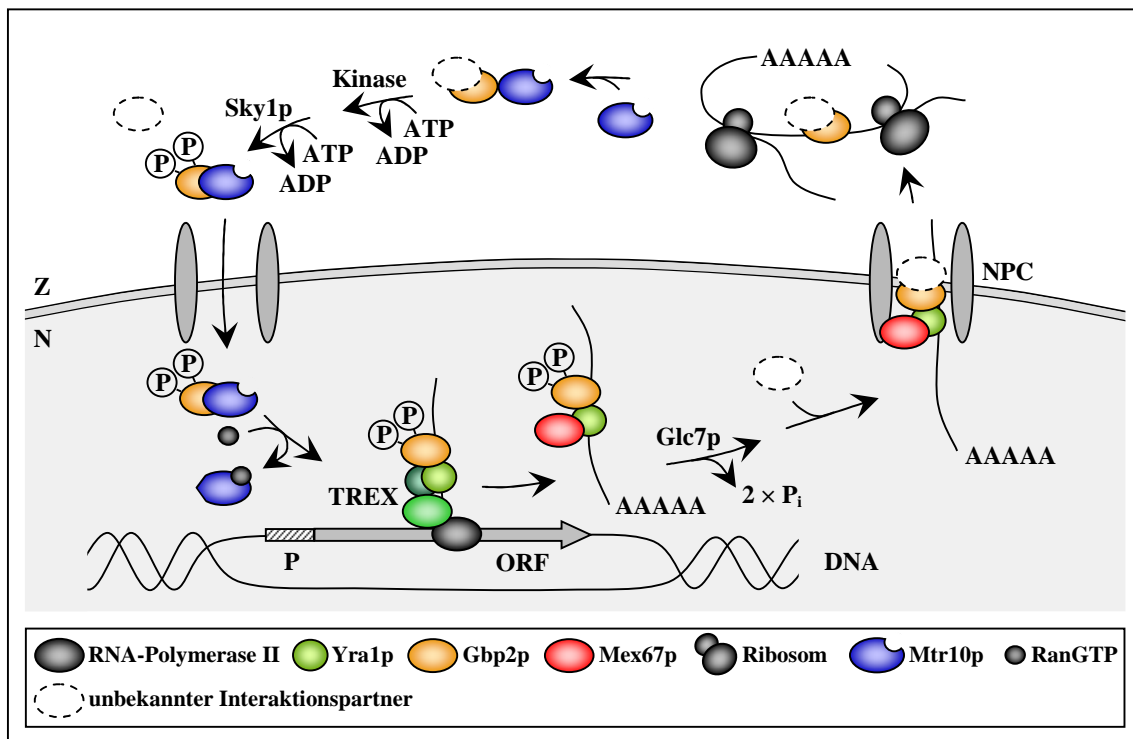


Abb. 21. Modell für den Funktionszyklus von Gbp2p. Nähere Erläuterungen siehe Text. A: Adenosin; N: Nukleoplasma; ORF: offener Leserahmen; P: Promotor; (P): Phosphatrest; P_i: anorganisches Phosphat; Z: Zytoplasma

mRNA-Molekülen abgelöst und ist daher potentiell auch in die Translationsinitiation oder -elongation involviert. Der Importrezeptor Mtr10p fördert den mRNA-Dissoziationsprozess erheblich. Im Anschluss an die mRNA-Dissoziation wird Gbp2p an dem in der RS-ähnlichen Domäne lokalisierten Serinrest 15 initial phosphoryliert. Die initiale Phosphorylierung wird entweder von einer unbekannten Kinase oder in einem sehr langsamen Schritt von der SR-Proteinkinase Sky1p vorgenommen und bestimmt den Zeitpunkt bzw. Ort der nachfolgenden, Sky1p-katalysierten Phosphorylierung des Serinrestes 17. Die Phosphorylierung von S17 festigt die Gbp2p-Mtr10p-Bindung - möglicherweise bewirkt sie die Ablösung der potentiellen Gbp2p-Interaktionspartner - und fördert so die vorrangig nukleäre Lokalisierung von Gbp2p. Eine zusätzliche Funktion der zytoplasmatischen Phosphorylierungen könnte die Verhinderung unspezifischer RNA-Bindungen sein. Aufgrund der hohen RanGTP-Konzentration zerfällt der Gbp2p-Mtr10p-Komplex nach dem Import, und Gbp2p bindet erneut an gerade entstehende Transkripte.

Für Hrb1p kann ein Modell postuliert werden, welches demjenigen von Gbp2p in vielerlei Hinsicht ähnelt. Hrb1p bindet mit Hilfe des THO/TREX-Komplexes an spezifische nukleäre Transkripte. Diese unterscheiden sich von den Gbp2p- und Npl3p-Substraten, da ihr Export Mtr2p-, Dbp5p- und Hmt1p-abhängig ist. Hrb1p verlässt den Zellkern in

Assoziation mit den Transkripten und wird im Verlauf der Translation von dem Importrezeptor Mtr10p abgelöst und re-importiert. Die vorrangig nukleäre Lokalisierung von Hrb1p ist zudem Sky1p-abhängig, und möglicherweise unterliegt Hrb1p einer zyklischen Phosphorylierung/Dephosphorylierung durch Sky1p und Glc7p. Weshalb Sky1p die nukleäre Lokalisierung von Hrb1p fördert, ist allerdings noch näher zu untersuchen.

Zusammengefasst leistet die vorliegende Arbeit einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung des nukleären mRNA-Exports. Die Proteine Gbp2p und Hrb1p aus *S. cerevisiae* konnten als neue Komponenten der exportierten mRNA-Proteinkomplexe identifiziert und als Mitglieder der Familie der SR- und SR-ähnlichen Proteine charakterisiert werden. Auffallende Unterschiede in den Exportbedingungen dieser Proteine sowie des dritten SR-ähnlichen Proteins Npl3p geben Hinweise auf die Existenz mehrerer, paralleler mRNA-Exportwege. Die präsentierten Daten erweitern zudem die Sicht auf die zytoplasmatischen Ereignisse nach erfolgtem mRNA-Export. So wurden 1) eine umfassende Analyse der Umstrukturierungen pendelnder mRNA-Bindeproteine vor und während der Translation vorgenommen, 2) signifikante Mengen von Gbp2p, Hrb1p, Npl3p und Dbp5p in Assoziation mit Polysomen identifiziert, 3) neue Erkenntnisse hinsichtlich des Mechanismus der mRNA-Dissoziation von Npl3p gewonnen und 4) ein Zusammenhang zwischen der mRNA-Dissoziation von Npl3p und der Translationseffizienz festgestellt. Es wird sehr interessant sein, experimentell auf die Ergebnisse aufzubauen, die einzelnen Vorgänge weiter zu beleuchten und die Modelle zu verfeinern.

5.5 Ausblick

Um die aufgestellten Modelle zu überprüfen und zu erweitern, würde sich zunächst eine weitergehende Analyse der Protein-Interaktionen von Gbp2p, Hrb1p und Npl3p und ihrer Regulationen anbieten. So könnten beispielsweise die für Gbp2p und Hrb1p postulierten, Sky1p-vermittelten Phosphorylierungen über *in vitro*-Kinase-Tests (Gilbert *et al.*, 2001) direkt nachgewiesen und lokalisiert werden. Für Gbp2p wurde dies in der vorliegenden Arbeit bereits mehrfach versucht. Das aus *sky1::TRP1*-Hefezellen gereinigte Substrat wurde jedoch vermutlich in lediglich suboptimalen Mengen eingesetzt, oder die initiale Phosphorylierung an dem Serinrest 15 ging während der Aufarbeitung verloren. Daher müsste der Kinase-Test mit größeren Mengen heterolog exprimierter Gbp2p-Moleküle wiederholt werden, und die initiale Phosphorylierung könnte dabei eventuell durch die Einführung eines negativ geladenen Aminosäurerestes an der Position 15 imitiert werden (Léger *et al.*, 1997; Estrera *et al.*, 2001; Narayan *et al.*, 2001). Zudem wäre interessant, die für die initiale Phosphorylierung verantwortliche Kinase zu identifizieren, um mehr über die Regulation

des nukleo-zytoplasmatischen Pendelns von Gbp2p zu erfahren. Ein Anfang könnte mit der Lokalisierung von Gbp2p in verschiedenen Kinasemutanten gemacht werden. Da unlängst beschrieben wurde, dass die Phosphatase Glc7p für die nukleäre Dephosphorylierung von Npl3p verantwortlich ist (Gilbert und Guthrie, 2004), sollte auch überprüft werden, ob Gbp2p und Hrb1p Substrate von Glc7p sind und somit einer zyklischen Phosphorylierung/Dephosphorylierung unterliegen.

Sobald es gelingt, Gbp2p in einem Komplex mit Mtr10p zu reinigen, und möglicherweise ist hier eine vorherige Quervernetzung der Moleküle hilfreich, kann der Einfluss der Phosphorylierung auf die Stärke dieser Bindung direkt untersucht werden. Interessant wäre die Frage, ob die Phosphorylierung die Bindung zwar *in vivo*, nicht aber *in vitro* verstärkt, da ihr Einfluss auf der Dissoziation anderer Proteine beruht. Diese anderen Proteine sollten deutlich stärker mit nicht-phosphoryliertem als mit phosphoryliertem Gbp2p ko-immunopräzipitieren und hierüber zu identifizieren sein. Um das postulierte Npl3p-Modell zu überprüfen, wären *in vitro*-Bindungsstudien mit gereinigten Npl3p-, Mtr10p- und Mex67p-Molekülen aufschlussreich: Hat die Phosphorylierung einen signifikant negativen Einfluss auf die Npl3p-Mex67p-Bindung und gleichzeitig einen positiven Einfluss auf die Npl3p-Mtr10p-Bindung?

Die Identifizierung bislang unbekannter Protein-Interaktionspartner von Gbp2p, Hrb1p und Npl3p könnte beispielsweise mit Hilfe von Immunopräzipitationen erfolgen und würde grundlegend dazu beitragen, das molekulare Umfeld abzustecken und die Proteine genauer in die mRNA-Exportmaschinerie einzuordnen. Hierbei wäre auch interessant, ob die Interaktionen direkt oder RNA-vermittelt stattfinden.

Neben den Protein-Interaktionen sind auch die mRNA-Interaktionen der drei SR-ähnlichen Proteine näher zu untersuchen. Die gebundenen mRNAs könnten durch Ko-Immunopräzipitation, RT-PCR und anschließende Sequenzierung der PCR-Produkte identifiziert werden. Handelt es sich bei den gebundenen Transkripten wie vermutet um separate Klassen, und binden Gbp2p und Hrb1p möglicherweise vorwiegend stressinduzierte mRNAs? Sicherlich wäre zur Beantwortung dieser Fragen auch der Einsatz der DNA-„Mikroarray“-Technologie (Ekins und Chu, 1999) sinnvoll. Bemerkenswerterweise sind in der *npl3-27*-Mutante nicht alle Proteinbanden in gleichem Maße reduziert (Abb. 18C). Eventuell lässt die Identifizierung der stark reduzierten Proteine - dies könnte mittels zweidimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie (Bonk und Humeny, 2001) geschehen - Rückschlüsse auf die von Npl3p gebundenen mRNAs zu. Um zu ermitteln, ob Gbp2p, Hrb1p und Npl3p an spezifische RNA-Sequenzen binden, würden sich beispielsweise „Footprint“-Analysen anbieten (Giel-Pietraszuk *et al.*, 1997). Mit weiteren Polysomen-Kosedimentations-Experimenten könnte geklärt werden, ob Mtr10p wie vermutet an der zytoplasmatischen mRNA-Dissoziation von Gbp2p und Hrb1p beteiligt ist. Interessant wäre

zudem die Frage, ob Mtr10p *in vitro* allein in der Lage ist, die mRNA-Bindung der Proteine zu lösen oder ob dazu auch die Passage von Ribosomen oder die Präsenz weiterer Moleküle erforderlich ist.

Da zahlreiche Schritte der Genexpression miteinander gekoppelt sind (Maniatis und Reed, 2002), ist die Hypothese, dass pendelnde mRNA-Bindeproteine den mRNA-Export mit der Translation koppeln, äußerst attraktiv und sollte weiterverfolgt werden. Wichtig wäre beispielsweise, den molekularen Hintergrund der Translationsinhibition durch Npl3p aufzuklären. Sind möglicherweise direkte Interaktionen zwischen Npl3p und bestimmten Komponenten der Translationsmaschinerie zu finden? Und beeinflussen auch die signifikant Polysomen-assoziierten Proteine Gbp2p, Hrb1p und Dbp5p die Translation in negativer oder positiver Weise?

Nicht zuletzt wäre eine vergleichende Analyse der Expressionsmuster der Gene *GBP2*, *HRB1* und *NPL3* mittels RT-PCR oder Northern Hybridisierung (Trayhurn, 1996) aufschlussreich. Eine erhöhte Expression unter spezifischen Bedingungen, im Fall von *GBP2* und *HRB1* möglicherweise bei Stress, könnte weitere Hinweise auf die Funktionen der kodierten Proteine liefern.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abruzzi KC, Lacadie S, Rosbash M (2004)** Biochemical analysis of TREX complex recruitment to intronless and intron-containing yeast genes. *EMBO J* 23: 2620-2631
- Aitchison JD, Blobel G, Rout MP (1996)** Kap104p: a karyopherin involved in the nuclear transport of messenger RNA binding proteins. *Science* 274: 624-267
- Amberg DC, Goldstein AL, Cole CN (1992)** Isolation and characterization of *RAT1*: An essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes Dev* 6: 1173-1189
- Anderson JT, Paddy MR, Swanson MS (1993)** Pub1 is a major nuclear and cytoplasmic polyadenylated RNA-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 13: 6102-6113
- Arts GJ, Fornerod M, Mattaj IW (1998)** Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr Biol* 8: 305-314
- Bachmann B (1983)** Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 7. *Microbiol Rev* 47: 180-230
- Bamba C, Bobinnec Y, Fukuda M, Nishida E (2002)** The GTPase Ran regulates chromosome positioning and nuclear envelope assembly *in vivo*. *Curr Biol* 12: 503-507
- Beelman CA, Parker R (1995)** Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* 81: 179-183
- Bensadoun A, Weinstein D (1976)** Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem* 70: 241-250
- Birnboim H, Doly J (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523
- Birney E, Kumar S, Krainer AR (1992)** A putative homolog of U2AF65 in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 20: 4663
- Birney E, Kumar S, Krainer AR (1993)** Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res* 21: 5803-5816
- Bischoff FR, Krebber H, Smirnova E, Dong W, Ponstingl H (1995)** Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J* 14: 705-715
- Bischoff FR, Scheffzek K, Ponstingl H (2002)** How Ran is regulated. *Results Probl Cell Differ* 35: 49-66
- Blevins MB, Smith AM, Phillips EM, Powers MA (2003)** Complex formation among the RNA export proteins Nup98, Rae1/Gle2, and TAP. *J Biol Chem* 278: 20979-20988
- Blobel G, Sabatini D (1971)** Dissociation of mammalian polysomes into subunits by puromycin. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 390-394
- Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, Fink GR (1987)** 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* 154: 164-175
- Bogerd HP, Benson RE, Truant R, Herold A, Phingbodhipakkiya M, Cullen BR (1999)** Definition of a consensus transportin-specific nucleocytoplasmic transport signal. *J Biol Chem* 274: 9771-9777
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Görlich D (2004)** Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10: 185-191
- Bonk T, Humeny A (2001)** MALDI-TOF-MS analysis of protein and DNA. *Neuroscientist* 7: 6-12

- Bossie MA, DeHoratius C, Barcelo G, Silver PA (1992)** A mutant nuclear protein with similarity to RNA-binding proteins interferes with nuclear import in yeast. *Mol Biol Cell* 3: 875-893
- Boucher L, Ouzounis CA, Enright AJ, Blencowe BJ (2001)** A genome-wide survey of RS domain proteins. *RNA* 7: 1693-1701
- Brodsky AS, Silver PA (2000)** Pre-mRNA processing factors are required for nuclear export. *RNA* 6: 1737-1749
- Burge CB, Tuschl T, Sharp PA (1999)** Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. In: Gesteland RF, Cech TR, Atkins JF (Hrsg.) *The RNA World*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 525-560
- Cáceres JF, Screaton GR, Krainer AR (1998)** A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev* 12: 55-66
- Calado A, Treichel N, Muller EC, Otto A, Kutay U (2002)** Exportin-5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA. *EMBO J* 21: 6216-6224
- Chan CC, Dostie J, Diem MD, Feng W, Mann M, Rappsilber J, Dreyfuss G (2004)** eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *RNA* 10: 200-209
- Chartrand P, Singer RH, Long RM (2001)** RNP localization and transport in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 297-310
- Chi NC, Adam EJ, Adam SA (1995)** Sequence and characterization of cytoplasmic nuclear protein import factor p97. *J Cell Biol* 130: 265-274
- Clarke L, Carbon J (1980)** Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature* 287: 504-509
- Clouse KN, Luo M-J, Zhou Z, Reed R (2001)** A Ran-independent pathway for export of spliced mRNA. *Nat Cell Biol* 3: 97-99
- Colwill K, Feng LL, Yeakley JM, Gish GD, Cáceres JF, Pawson T, Fu X-D (1996)** SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors. *J Biol Chem* 271: 24569-24575
- Costa PJ, Arndt KM (2000)** Synthetic lethal interactions suggest a role for the *Saccharomyces cerevisiae* Rtf1 protein in transcription elongation. *Genetics* 156: 535-547
- Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, Chait BT, Matunis MJ (2002)** Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* 158: 915-927
- Cullen BR (2003)** Nuclear RNA export. *J Cell Sci* 116: 587-597
- Dagher SF, Fu X-D (2001)** Evidence for a role of Sky1p-mediated phosphorylation in 3' splice site recognition involving both Prp8 and Prp17/Slu4. *RNA* 7: 1284-1297
- Daneholt B (1997)** A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell* 88: 585-588
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991)** "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008
- Dostie J, Dreyfuss G (2002)** Translation is required to remove Y14 from mRNAs in the cytoplasm. *Curr Biol* 12: 1060-1067
- Dreyfuss G, Matunis MJ, Piñol-Roma S, Burd CG (1993)** hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 62: 289-321

- Duncan K, Umen JG, Guthrie C (2000)** A putative ubiquitin ligase required for efficient mRNA export differentially affects hnRNP transport. *Curr Biol* 10: 687-696
- Ekins R, Chu FW (1999)** Microarrays: their origins and applications. *Trends Biotechnol* 17: 217-218
- Enenkel C, Blobel G, Rexach M (1995)** Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes. *J Biol Chem* 270: 16499-16502
- Englmeier L, Olivo JC, Mattaj IW (1999)** Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. *Curr Biol* 9: 30-41
- Erkmann JA, Kutay U (2004)** Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Exp Cell Res* 296: 12-20
- Estrera VT, Chen D-T, Luo W, Hixson DC, Lin S-H (2001)** Signal transduction by the CEACAM1 tumor suppressor. *J Biol Chem* 276: 15547-15553
- Estruch F, Cole CN (2003)** An early function during transcription for the yeast mRNA export factor Dbp5p/Rat8p suggested by its genetic and physical interactions with transcription factor IIH components. *Mol Biol Cell* 14: 1664-1676
- Fahrenkrog B, Aebi U (2003)** The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Mol Cell Biol* 4: 757-766
- Farago M, Nahari T, Hammel C, Cole CN, Choder M (2003)** Rpb4p, a subunit of RNA polymerase II, mediates mRNA export during stress. *Mol Biol Cell* 14: 2744-2755
- Feldherr CM, Akin D (1997)** The location of the transport gate in the nuclear pore complex. *J Cell Sci* 110: 3065-3070
- Fischer T, Sträßer K, Rácz A, Rodríguez-Navarro S, Oppizzi M, Ihrig P, Lechner J, Hurt E (2002)** The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. *EMBO J* 21: 5843-5852
- Flach J, Bossie M, Vogel J, Corbett A, Jinks T, Willins DA, Silver PA (1994)** A yeast RNA-binding protein shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Mol Cell Biol* 14: 8399-8407
- Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW (1997)** Crm1 is an export receptor for leucine rich nuclear export signals. *Cell* 90: 1051-1060
- Frey S, Pool M, Seedorf M (2001)** Scp160p, an RNA-binding, polysome-associated protein, localizes to the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae* in a microtubule-dependent manner. *J Biol Chem* 276: 15905-15912
- Fried H, Kutay U (2003)** Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* 60: 1659-1688
- Gallouzi JE, Steitz JA (2001)** Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides. *Science* 294: 1895-1901
- Galy V, Gadal O, Fromont-Racine M, Romano A, Jacquier A, Nehrbass U (2004)** Nuclear retention of unspliced mRNAs in yeast is mediated by perinuclear Mlp1. *Cell* 116: 63-73
- Giel-Pietraszuk M, Barciszewska MZ, Mucha P, Rekowski P, Kupryszewski G, Barciszewski J (1997)** Interaction of HIV Tat model peptides with tRNA and 5S rRNA. *Acta Biochim Pol* 44: 591-600
- Gietz D, St. Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992)** Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20: 1425
- Gilbert W, Guthrie C (2004)** The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA. *Mol Cell* 13: 201-212

- Gilbert W, Siebel CW, Guthrie C (2001)** Phosphorylation by Sky1p promotes Npl3p shuttling and mRNA dissociation. *RNA* 7: 302-313
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999)** eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68: 913-963
- Görllich D, Dabrowski M, Bischoff FR, Kutay U, Bork P, Hartmann E, Prehn S, Izaurralde E (1997)** A novel class of RanGTP binding proteins. *J Cell Biol* 138: 65-80
- Görllich D, Kostka S, Kraft R, Dingwall C, Laskey RA, Hartmann E, Prehn S (1995)** Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol* 5: 383-392
- Görllich D, Kutay U (1999)** Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 607-660
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hohcisel JD, Jacq C, Johnston II, Louis EJ, Newco HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996)** Life with 6000 genes. *Science* 274: 546-547
- González CI, Ruiz-Echevarría MJ, Vasudevan S, Henry MF, Peltz SW (2000)** The yeast hnRNP-like protein Hrp1/Nab4 marks a transcript for nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell* 5: 489-499
- Gorsch LC, Dockendorff TC, Cole CN (1995)** A conditional allele of the novel repeat-containing yeast nucleoporin RAT7/NUP159 causes both rapid cessation of mRNA export and reversible clustering of nuclear pore complexes. *J Cell Biol* 129: 939-955
- Graveley BR (2000)** Sorting out the complexity of SR protein function. *RNA* 6: 1197-1211
- Graveley BR, Maniatis T (1998)** Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 1: 765-771
- Green DM, Johnson CP, Hagan H, Corbett AH (2003)** The C-terminal domain of myosin-like protein 1 (Mlp1p) is a docking site for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins that are required for mRNA export. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1010-1015
- Green DM, Marfatia KA, Crafton EB, Zhang X, Cheng X, Corbett AH (2002)** Nab2p is required for poly(A) RNA export in *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by arginine methylation via Hmt1p. *J Biol Chem* 277: 7752-7760
- Grosshans H, Deinert K, Hurt E, Simos G (2001)** Biogenesis of the signal recognition particle (SRP) involves import of SRP proteins into the nucleolus, assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p-mediated export. *J Cell Biol* 153: 745-761
- Häcker S, Krebber H (2004)** Differential export requirements for shuttling serine/arginine-type mRNA-binding proteins. *J Biol Chem* 279: 5049-5052
- Hanahan D (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580
- Harreman MT, Kline TM, Milford HG, Harben MB, Hodel AE, Corbett AH (2004)** Regulation of nuclear import by phosphorylation adjacent to nuclear localization signals. *J Biol Chem* 279: 20613-20621
- Hector RE, Nykamp KR, Dheur S, Anderson JT, Non PJ, Urbinati CR, Wilson SM, Minvielle-Sebastia L, Swanson MS (2002)** Dual requirement for yeast hnRNP Nab2p in mRNA poly(A) tail length control and nuclear export. *EMBO J* 21: 1800-1810
- Hellmuth K, Lau DM, Bischoff FR, Künzler M, Hurt E, Simos G (1998)** Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. *Mol Cell Biol* 18: 6374-6386

- Henry M, Borland CZ, Bossie M, Silver PA (1996)** Potential RNA binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae* identified as suppressors of temperature-sensitive mutations in *NPL3*. *Genetics* 142: 103-115
- Henry MF, Silver PA (1996)** A novel methyltransferase (Hmt1p) modifies poly(A)⁺-RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 16: 3668-3678
- Hieronymus H, Silver PA (2003)** Genome-wide analysis of RNA-protein interactions illustrates specificity of the mRNA export machinery. *Nat Genet* 33: 155-161
- Hodge CA, Colot HV, Stafford P, Cole CN (1999)** Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of *xpo1-1* cells. *EMBO J* 18: 5778-5788
- Horton LE, James P, Craig EA, Hensold JO (2001)** The yeast hsp70 homologue Ssa is required for translation and interacts with Sis1 and Pab1 on translating ribosomes. *J Biol Chem* 276: 14426-14433
- Horvath A, Riezman H (1994)** Rapid protein extraction from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1305-1310
- Huang Y, Gattoni R, Stévenin J, Steitz JA (2003)** SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol Cell* 11: 837-843
- Huang Y, Steitz JA (2001)** Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol Cell* 7: 899-905
- Huang Y, Yario TA, Steitz JA (2004)** A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9666-9670
- Huber J, Cronshagen U, Kadokura M, Marshallsay C, Wada T, Sekine M, Lührmann R (1998)** Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *EMBO J* 17: 4114-4126
- Hurt E, Luo M-J, Röther S, Reed R, Sträßer K (2004)** Cotranscriptional recruitment of the serine-arginine-rich (SR)-like proteins Gbp2 and Hrb1 to nascent mRNA via the TREX complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1858-1862
- Iborra FJ, Jackson DA, Cook PR (2000)** The path of RNA through nuclear pores: apparent entry from the sides into specialized pores. *J Cell Sci* 113: 291-302
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990)** High efficient transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28
- Inoue K, Mizuno T, Wada K, Hagiwara M (2000)** Novel RING finger proteins, Air1p and Air2p, interact with Hmt1p and inhibit the arginine methylation of Npl3p. *J Biol Chem* 275: 32793-32799
- Ishigaki Y, Li X, Serin G, Maquat LE (2001)** Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106: 607-617
- Izaurrealde E (2004)** Directing mRNA export. *Nat Struct Mol Biol* 11: 210-212
- Jäkel S, Görlich D (1998)** Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J* 17: 4491-4502
- Jensen TH, Boulay J, Rosbash M, Libri D (2001)** The DECD box putative ATPase Sub2p is an early mRNA export factor. *Curr Biol* 11: 1711-1715
- Jensen TH, Dower K, Libri D, Rosbash M (2003)** Early formation of mRNP: license for export or quality control? *Mol Cell* 11: 1129-1138

- Jin L, Guzik BW, Bor YC, Rekosh D, Hammarskjöld ML (2003)** Tap and NXT promote translation of unspliced mRNA. *Genes Dev* 17: 3075-3086
- Katahira J, Sträßer K, Podtelejnikov A, Mann M, Jung JJ, Hurt EC (1999)** The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J* 18: 2593-2609
- Kataoka N, Diem MD, Kim VN, Yong J, Dreyfuss G (2001)** Magoh, a human homolog of *Drosophila* mago nashi protein, is a component of the splicing-dependent exon-exon junction complex. *EMBO J* 20: 6424-6433
- Keminer O, Peters R (1999)** Permeability of single nuclear pores. *Biophys J* 77: 217-228
- Kessler MM, Henry MF, Shen E, Zhao J, Gross S, Silver PA, Moore CL (1997)** Hrp1, a sequence-specific RNA-binding protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm, is required for mRNA 3'-end formation in yeast. *Genes Dev* 11: 2545-2556
- Kim VN, Kataoka N, Dreyfuss G (2001)** Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Science* 293: 1832-1836
- Kiseleva E, Allen TD, Rutherford S, Bucci M, Wentz SR, Goldberg MW (2004)** Yeast nuclear pore complexes have a cytoplasmic ring and internal filaments. *J Struct Biol* 145: 272-288
- Klebe C, Bischoff FR, Ponstingl H, Wittinghofer A (1995)** Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins RCC1 and RanGAP1. *Biochemistry* 34: 639-647
- Kloc M, Zearfoss NR, Etkin LD (2002)** Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell* 108: 533-544
- Koizumi J, Okamoto Y, Onogi H, Mayeda A, Krainer AR, Hagiwara M (1999)** The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). *J Biol Chem* 274: 11125-11131
- Konkel LMC, Enomoto S, Chamberlain EM, McCune-Zierath P, Iyadurai SJP, Berman J (1995)** A class of single-stranded telomeric DNA-binding proteins required for Rap1p localization in yeast nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5558-5562
- Krebber H, Taura T, Lee MS, Silver PA (1999)** Uncoupling of the hnRNP Npl3p from mRNAs during the stress-induced block in mRNA export. *Genes Dev* 13: 1994-2004
- Kyhse-Andersen J (1984)** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10: 203-209
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of the structural protein during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lai M-C, Lin RI, Tarn W-Y (2001)** Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10154-10159
- Lai M-C, Tarn W-Y (2004)** Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins. *J Biol Chem* 279: 31745-31749
- Lee DCY, Aitchison JD (1999)** Kap104p-mediated nuclear import. *J Biol Chem* 274: 29031-29037
- Lee MS, Henry M, Silver PA (1996)** A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. *Genes Dev* 10: 1233-1246
- Léger J, Kempf M, Lee G, Brandt R (1997)** Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of microtubule-associated protein tau. *J Biol Chem* 272: 8441-8446

- Le Hir H, Gatfield D, Izaurralde E, Moore MJ (2001)** The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J* 20: 4987-4997
- Lei EP, Krebber H, Silver PA (2001)** Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription. *Genes Dev* 15: 1771-1782
- Lei EP, Silver PA (2002)** Intron status and 3'-end formation control cotranscriptional export of mRNA. *Genes Dev* 16: 2761-2766
- Lei EP, Stern CA, Fahrenkrog B, Krebber H, Moy TI, Aebi U, Silver PA (2003)** Sac3 is an mRNA export factor that localizes to cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex. *Mol Biol Cell* 14: 836-847
- Lejeune F, Ishigaki Y, Li X, Maquat LE (2002)** The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: Dynamics of mRNP remodeling. *EMBO J* 21: 3536-3545
- Lewis JD, Izaurralde E (1997)** The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *Eur J Biochem* 247: 461-469
- Lin J-J, Zakian VA (1994)** Isolation and characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* genes that encode proteins that bind to (TG₁₋₃)_n single strand telomeric DNA *in vitro*. *Nucleic Acids Res* 22: 4906-4913
- Liu Q, Dreyfuss G (1995)** *In vivo* and *in vitro* arginine methylation of RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 15: 2800-2808
- Liu Y, Guo W, Tartakoff PY, Tartakoff AM (1999)** A Crm1p-independent nuclear export path for the mRNA-associated protein, Npl3p/Mtr13p. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6739-6744
- Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004)** Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303: 95-98
- Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ (1991)** High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108: 1-6
- Luo M-J, Zhou Z, Magni K, Christoforides C, Rappsilber J, Mann M, Reed R (2001)** Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. *Nature* 413: 644-647
- Macara IG (2001)** Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 570-594
- Maniatis T, Reed R (2002)** An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416: 499-506
- Maquat LE (2004)** Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 89-99
- Maul GG (1977)** The nuclear and the cytoplasmic pore complex: structure, dynamics, distribution, and evolution. *Int Rev Cytol Suppl* 6: 75-186
- Minvielle-Sebastia L, Beyer K, Krecic AM, Hector RE, Swanson MS, Keller W (1998)** Control of cleavage site selection during mRNA 3' end formation by a yeast hnRNP. *EMBO J* 17: 7454-7468
- Minvielle-Sebastia L, Preker PJ, Wiederkehr T, Strahm Y, Keller W (1997)** The major yeast poly(A)-binding protein is associated with cleavage factor IA and functions in premessenger RNA 3'-end formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7897-7902
- Moroianu J, Blobel G, Radu A (1995)** Previously identified protein of uncertain function is karyopherin alpha and together with karyopherin beta docks import substrate at nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2008-2011

- Mosammaparast N, Guo Y, Shabanowitz J, Hunt DF, Pemberton LF (2002)** Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast. *J Biol Chem* 277: 862-868
- Nachury MV, Weis K (1999)** The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9622-9627
- Nakielnny S, Dreyfuss G (1999)** Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* 99: 677-690
- Narayan M, Kusuhara K, Green PL (2001)** Phosphorylation of two serine residues regulates human T-cell leukemia virus type 2 Rex function. *J Virol* 75: 8440-8448
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988)** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255-262
- Neville M, Rosbash M (1999)** The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 18: 3746-3756
- Nolen B, Yun CY, Wong CF, McCammon JA, Fu X-D, Ghosh G (2001)** The structure of Sky1p reveals a novel mechanism for constitutive activity. *Nature Struct Biol* 8: 176-183
- Nott A, Le Hir H, Moore MJ (2004)** Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes Dev* 18: 210-222
- Ohno M, Segref A, Bachi A, Wilm M, Mattaj IW (2000)** PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* 101: 187-198
- Ohno M, Segref A, Kuersten S, Mattaj IW (2002)** Identity elements used in export of mRNAs. *Mol Cell* 9: 659-671
- Palmeri D, Malim MH (1999)** Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha. *Mol Cell Biol* 19: 1218-1225
- Pang T-L, Wang C-Y, Hsu C-L, Chen M-Y, Lin J-J (2003)** Exposure of single-stranded telomeric DNA causes G₂/M cell cycle arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278: 9318-9321
- Panté N, Kann M (2002)** Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of ~39 nm. *Mol Biol Cell* 13: 425-434
- Paraskeva E, Izaurralde E, Bischoff FR, Huber J, Kutay U, Hartmann E, Lührmann R, Görlich D (1999)** CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J Cell Biol* 145: 255-264
- Pemberton LF, Rosenblum JS, Blobel G (1997)** A distinct and parallel pathway for nuclear import of an mRNA-binding protein. *J Cell Biol* 139: 1645-1653
- Popa I, Harris ME, Donello JE, Hope TJ (2002)** CRM1-dependent function of a *cis*-acting RNA export element. *Mol Cell Biol* 22: 2057-2067
- Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ (2002)** Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108: 501-512
- Reed R, Hurt E (2002)** A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* 108: 523-531
- Reichelt R, Holzenburg A, Buhle EL Jr, Jarnik M, Engel A, Aebi U (1990)** Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol* 110: 883-894
- Ribbeck K, Görlich D (2001)** Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J* 20: 1320-1330

- Ribbeck K, Görlich D (2002)** The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J* 21: 2664-2671
- Rodrigues JP, Rode M, Gatfield D, Blencowe BJ, Carmo-Fonseca M, Izaurralde E (2001)** REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1030-1035
- Rodríguez-Navarro S, Fischer T, Luo M-J, Antúnez O, Brettschneider S, Lechner J, Pérez-Ortín JE, Reed R, Hurt E (2004)** Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell* 116: 75-86
- Rondón AG, Jimeno S, García-Rubio M, Aguilera A (2003)** Molecular evidence that the eukaryotic THO/TREX complex is required for efficient transcription elongation. *J Biol Chem* 278: 39037-39043
- Rose MD, Winston F, Hieter P (1990)** Methods in yeast genetics. A laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Rout MP, Aitchison JD, Suprapto A, Hjertaas K, Zhao Y, Chait BT (2000)** The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* 148: 635-651
- Rout MP, Blobel G (1993)** Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* 123: 771-783
- Rout MP, Blobel G, Aitchison JD (1997)** A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell* 89: 715-725
- Russell ID, Tollervey D (1992)** NOP3 is an essential yeast protein which is required for pre-rRNA processing. *J Cell Biol* 119: 737-747
- Ryan KJ, McCaffery JM, Wentz SR (2003)** The Ran GTPase cycle is required for yeast nuclear pore complex assembly. *J Cell Biol* 160: 1041-1053
- Saavedra CA, Hammell CM, Heath CV, Cole CN (1997)** Yeast heat shock mRNAs are exported through a distinct pathway defined by Rip1p. *Genes Dev* 11: 2845-2856
- Sacco-Bubulya P, Spector DL (2002)** Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol* 156: 425-436
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanford JR, Gray NK, Beckmann K, Cáceres JF (2004)** A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev* 18: 755-768
- Sanford JR, Longman D, Cáceres JF (2003)** Multiple roles of the SR protein family in splicing regulation. *Prog Mol Subcell Biol* 31: 33-58
- Santos-Rosa H, Moreno H, Simos G, Segref A, Fahrenkrog B, Panté N, Hurt E (1998)** Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Mol Cell Biol* 18: 6826-6838
- Seedorf M, Silver PA (1997)** Importin/karyopherin protein family members required for mRNA export from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8590-8595
- Segref A, Sharma K, Doye V, Hellwig A, Huber J, Lührmann R, Hurt E (1997)** Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *EMBO J* 16: 3256-3271

- Senger B, Simos G, Bischoff FR, Podtelejnikov A, Mann M, Hurt E (1998)** Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p. *EMBO J* 17: 2196-2207
- Shen EC, Henry MF, Weiss VH, Valentini SR, Silver PA, Lee MS (1998)** Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev* 12: 679-691
- Shen EC, Stage-Zimmermann T, Chui P, Silver PA (2000)** The yeast mRNA-binding protein Npl3p interacts with the cap-binding complex. *J Biol Chem* 275: 23718-23724
- Sherman F (1981)** Genetic Nomenclature. In: Strathern JN, Jones EW, Broach JR (Hrsg.) *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 639-640
- Shuman S (2001)** Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66: 1-40
- Siebel CW, Feng L, Guthrie C, Fu XD (1999)** Conservation in budding yeast of a kinase specific for SR splicing factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5440-5445
- Sikorski RS, Hieter P (1989)** A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19-27
- Siomi MC, Eder PS, Kataoka N, Wan L, Liu Q, Dreyfuss G (1997)** Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins. *J Cell Biol* 138: 1181-1192
- Smith A, Brownswell A, Macara IG (1998)** Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr Biol* 8: 1403-1406
- Snay-Hodge CA, Colot HV, Goldstein AL, Cole CN (1998)** Dbp5p/Rat8p is a yeast nuclear pore-associated DEAD-box protein essential for RNA export. *EMBO J* 17: 2663-2676
- Stoffler D, Feja B, Fahrenkrog B, Walz J, Typke D, Aebi U (2003)** Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture – implications for nucleocytoplasmic transport. *J Mol Biol* 328: 119-130
- Sträßer K, Baßler J, Hurt E (2000)** Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *J Cell Biol* 150: 695-706
- Sträßer K, Hurt E (2000)** Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export. *EMBO J* 19: 410-420
- Sträßer K, Hurt E (2001)** Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature* 413: 648-652
- Sträßer K, Masuda S, Mason P, Pfannstiel J, Oppizzi M, Rodríguez-Navarro S, Rondón AG, Aguilera A, Struhl K, Reed R, Hurt E (2002)** TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417: 304-308
- Strahm Y, Fahrenkrog B, Zenklusen D, Rychner E, Kantor J, Rosbash M, Stutz F (1999)** The RNA export factor Gle1p is located on the cytoplasmic fibrils of the NPC and physically interacts with the FG-nucleoporin Rip1p, the DEAD-box protein Rat8p/Dbp5p and a new protein Ymr255p. *EMBO J* 18: 5761-5777
- Strawn LA, Shen T, Wente SR (2001)** The GLFG regions of Nup116p and Nup100p serve as binding sites for both Kap95p and Mex67p at the nuclear pore complex. *J Biol Chem* 276: 6445-6452
- Strom AC, Weis K (2001)** Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biol* 2: reviews 3008.1-3008.9

- Stutz F, Bachi A, Doerks T, Braun IC, Séraphin B, Wilm M, Bork P, Izaurralde E (2000)** REF, an evolutionarily conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. *RNA* 6: 638-650
- Stutz F, Izaurralde E (2003)** The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends Cell Biol* 13: 319-327
- Suntharalingam M, Alcázar-Román AR, Wente SR (2004)** Nuclear export of the yeast mRNA-binding protein Nab2 is linked to a direct interaction with Gfd1 and to Gle1 function. *J Biol Chem* 279: 35384-35391
- Tacke R, Chen Y, Manley JL (1997)** Sequence-specific RNA binding by an SR protein requires RS domain phosphorylation: creation of an SRp40-specific splicing enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1148-1153
- Taura T, Krebber H, Silver PA (1998)** A member of the Ran-binding protein family, Yrb2p, is involved in nuclear protein export. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7427-7432
- Thomas F, Kutay U (2003)** Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway. *J Cell Sci* 116: 2409-2419
- Trayhurn P (1996)** Northern blotting. *Proc Nutr Soc* 55: 583-589
- Truant R, Cullen BR (1999)** The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol* 19: 1210-1217
- Ullman KS (2002)** RNA export: searching for mRNA identity. *Curr Biol* 12: R461-R463
- Vasu SK, Forbes DJ (2001)** Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol* 13: 363-375
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA *et al.* (2001)** The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351
- Wahle E, Rügsegger U (1999)** 3'-end processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 23: 277-295
- Wang H-Y, Lin W, Dyck JA, Yeakley JM, Songyang Z, Cantley LC, Fu X-D (1998)** SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J Cell Biol* 140: 737-750
- Wiegand HL, Coburn GA, Zeng Y, Kang Y, Bogerd HP, Cullen BR (2002)** Formation of Tap/NXT1 heterodimers activates Tap-dependent nuclear mRNA export by enhancing recruitment to nuclear pore complexes. *Mol Cell Biol* 22: 245-256
- Wilkinson MF, Shyu A-B (2002)** RNA surveillance by nuclear scanning? *Nat Cell Biol* 4: E144-E147
- Windgassen M, Krebber H (2003)** Identification of Gbp2 as a novel poly(A)⁺ RNA-binding protein involved in the cytoplasmic delivery of messenger RNAs in yeast. *EMBO Rep* 4: 278-283
- Winston F, Dollard C, Ricupero-Hovasse, SL (1995)** Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* 11: 53-55
- Wolff B, Sanglier JJ, Wang Y (1997)** Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleocytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem Biol* 4: 139-147
- Wozniak RW, Lusk CP (2003)** Nuclear pore complexes. *Curr Biol* 13: R169

- Xiao SH, Manley JL (1997)** Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev* 11: 334-344
- Yang J, Bogerd HP, Wang PJ, Page DC, Cullen BR (2001)** Two closely related human nuclear export factors utilize entirely distinct export pathways. *Mol Cell* 8: 397-406
- Yun CY, Fu X-D (2000)** Conserved SR protein kinase functions in nuclear import and its action is counteracted by arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 150: 707-717
- Yun CY, Velazquez-Dones AL, Lyman SK, Fu X-D (2003)** Phosphorylation-dependent and -independent nuclear import of RS domain-containing splicing factors and regulators. *J Biol Chem* 278: 18050-18055
- Zenklusen D, Vinciguerra P, Strahm Y, Stutz F (2001)** The yeast hnRNP-like proteins Yra1p and Yra2p participate in mRNA export through interaction with Mex67p. *Mol Cell Biol* 21: 4219-4232
- Zenklusen D, Vinciguerra P, Wyss J-C, Stutz F (2002)** Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p. *Mol Cell Biol* 22: 8241-8253
- Zhang M, Green MR (2001)** Identification and characterization of yUAP/Sub2p, a yeast homolog of the essential human pre-mRNA splicing factor hUAP56. *Genes Dev* 15: 30-35
- Zhao J, Hyman L, Moore C (1999)** Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 405-445
- Zhao J, Jin S-B, Björkroth B, Wieslander L, Daneholt B (2002)** The mRNA export factor Dbp5 is associated with Balbiani ring mRNP from gene to cytoplasm. *EMBO J* 21: 1177-1187

7. ANHANG

7.1 Abkürzungen

Die Angabe von physikalischen Größen basiert auf dem Internationalen Einheitensystem.

| | |
|-----------------|--------------------------------|
| Abb. | Abbildung |
| abs. | absolut |
| A. dest. | Aqua destillata |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| Amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| Da | Dalton |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FCS | fötales Kälberserum |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FOA | 5-Fluoroorotsäure |
| g | Erdbeschleunigung |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GFP | grün-fluoreszierendes Protein |

| | |
|--------------|--|
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HPLC | Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalaktosid |
| Kan | Kanamycin |
| kb | Kilobasenpaare |
| LB | Luria Bertani-Medium |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure |
| OD | optische Dichte |
| P | Promotor |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PMSF | Phenylmethansulfonsäurefluorid |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rRNA | ribosomale Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SSC | Standard-Saline-Citrat |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TB | Transformationspuffer |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| Tet | Tetracyclin |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| tRNA | Transfer-Ribonukleinsäure |
| TRSC | Texas Red-sulfonylchlorid |

| | |
|--------------|---|
| U | Enzymeinheit |
| ü.N. | über Nacht |
| UpM | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolett |
| vgl. | vergleiche |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| w/v | Gewicht pro Volumen |
| X-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid |
| YPD | Hefeextrakt-Pepton-Glukose |

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|----------------|---------------------------------|
| Name: | Merle Windgassen |
| Geburtsdatum: | 30.03.1975 |
| Anschrift: | Siegelberg 106, 42399 Wuppertal |
| Geburtsort: | Wuppertal |
| Familienstand: | ledig |

Schulausbildung

| | |
|------------|-------------------------------------|
| 1981-1985 | Grundschule Siegelberg in Wuppertal |
| 1985-1994 | Märkisches Gymnasium Schwelm |
| 08.06.1994 | Allgemeine Hochschulreife |

Hochschulstudium

| | |
|-------------------|--|
| 1994-2000 | Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum |
| 10/1994 – 07/1996 | Grundstudium |
| 27.08.1996 | Vordiplom |
| 10/1996 – 02/2000 | Hauptstudium |
| | Schwerpunkte: Mikrobiologie, Molekularbiologie, Genetik, Botanik |
| 02/1999 – 02/2000 | Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen mit dem Thema „Proteinsekretion in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : Untersuchung der Rolle periplasmatischer Proteasen durch Insertionsmutagenese“ |
| 18.04.2000 | Diplom-Biologin |
| | Prüfungsfächer: Mikrobiologie, Botanik, Immunologie |
| Seit 10/2002 | Ergänzungsstudiengang Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg/Lahn |
| | Prüfungsfächer: Molekularbiologie, Zellbiologie, Biochemie |

Promotion

Seit 01/2001 Promotionsarbeit am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg/Lahn mit dem Thema „Identifizierung von Gbp2p und Hrb1p als am nukleären mRNA-Export beteiligte Proteine und Analyse der zytoplasmatischen Umstrukturierungen exportierter mRNA-Proteinkomplexe“

Wissenschaftliche Beschäftigungen

04/2000 – 10/2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen der Ruhr-Universität Bochum, Forschungsarbeit im Projekt „Proteindegradierung im Periplasma von *Pseudomonas aeruginosa*“

01/2001 – 03/2004 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Sonstiges

27.10.1998 Studienabschluss-Stipendiatin der Ruth und Gert Massenberg-Stiftung für den Fachbereich Biologie

30.11.2000 Auszeichnung mit dem „Preis an Studierende für das Jahr 2000“ der Ruhr-Universität Bochum

7.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Bochum:

Bandelow, Bennecke, Bohne, Curio, Falkenberg, Gerwert, Glitsch, Götze, Hablick, Hatt, Hauser, Hemetsberger, Heumann, Hillebrand, Hoffmann, Holländer-Czytko, Hovemann, Hüther, Jäger, Kempken, Kircher, Klipp, Kück, Masepohl, Mehlhorn, Necker, Riedel, Rüger, Schaub, Schlitter, Schmidt, Starlinger, Stützel, Svoboda, Träbert, Weiler, Zinkler

Und in Marburg:

Krebber, Müller

7.4 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf Müller für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die guten Arbeitsmöglichkeiten, die motivierenden Diskussionen und die Übernahme des Referats.

Frau Dr. Heike Krebber bin ich für die interessante und aktuelle Themenstellung, die engagierte Betreuung mit zahlreichen wertvollen Hinweisen und Anregungen und das hervorragende Arbeitsumfeld in ihrem Labor ausgesprochen dankbar.

Herrn Dr. Matthias Seedorf vom ZMBH in Heidelberg danke ich für die fruchtbare Kooperation, die Hilfe bei den Saccharose-Dichtegradienten und das viele Animpfen.

Ein großes Dankeschön an meine Kollegen/-innen Christoph Baumann, Ulrike Beyer, Ingo Böttcher, Sabine Häcker, Melanie Janning, Alexander Kurz, Andrea Neundorf, Andreas Rösser, Gabi Steinhäuser und Dorothée Sturm für die freundschaftliche Zusammenarbeit im „Krebber-Lab“. Andreas Rösser und Ulrike Beyer gilt darüber hinaus mein besonderer Dank für ihre engagierte Unterstützung bei Western Blots, Midi-Präps und vielem mehr. Heather Doty, Thomas Grünig, Dr. Dagmar Heine, Anne Kienitz, Tina Schmidt, Celia Vogel und Klaus Weber möchte ich insbesondere für die schönen, gemeinsam verbrachten Stunden außerhalb des Labors danken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Müller gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft. Vielen Dank an Herrn Dr. Holger Bastians für die nützlichen Ratschläge im Rahmen meiner Projektpräsentationen und an Frau Ulrike Schülke für die Unterstützung in organisatorischen Fragen.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Bernhard Dobberstein am ZMBH in Heidelberg danke ich für die freundliche Aufnahme während meiner zahlreichen Besuche.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich herzlich für ihren Rückhalt danken. Meinen Eltern und Christian gilt hierbei für die so vielfältige und großartige Unterstützung mein besonderer Dank.

Außerdem vielen Dank für verschiedenartigste Unterstützung an alle, die mir geholfen haben und hier vergessen wurden.

7.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Merle Windgassen, geboren am 30.03.1975 in Wuppertal, ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Identifizierung von Gbp2p und Hrb1p als am nukleären mRNA-Export beteiligte Proteine und Analyse der zytoplasmatischen Umstrukturierungen exportierter mRNA-Proteinkomplexe“ im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg/Lahn unter Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Müller und Frau Dr. H. Krebber ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Auszüge der vorliegenden Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht bzw. werden zur Veröffentlichung vorbereitet:

Fachartikel

Windgassen M, Krebber H (2003)

Identification of Gbp2 as a novel poly(A)⁺ RNA-binding protein involved in the cytoplasmic delivery of messenger RNAs in yeast.

EMBO Rep 4: 278-283

Windgassen M*, Sturm D*, Cajigas IJ, González CI, Seedorf M, Bastians H, Krebber H (* Ko-Erstauterschaft)

Yeast shuttling SR-proteins Npl3p, Gbp2p and Hrb1p are part of the translating mRNPs and Npl3p can function as a translational repressor.

In Überarbeitung

Sturm D, Windgassen M, Seedorf M, Krebber H

Significant amounts of the RNA helicase Dbp5p are associated with translating mRNPs.

In Vorbereitung

Poster**Windgassen M, Krebber H (2002)**

Gbp2p is a novel shuttling protein in *Saccharomyces cerevisiae* involved in mRNA export.
International Symposium of the SFB523 on Structure of the Nucleus and Trafficking of
RNPs in the Cell, Göttingen

Windgassen M, Krebber H (2002)

Gbp2p is a novel shuttling protein in *Saccharomyces cerevisiae* involved in mRNA export.
Fourth Workshop of the SFB286 on Intracellular Transport and Maturation of Proteins,
Marburg

Vorträge**Windgassen M, Krebber H (2001)**

RNA binding proteins involved in mRNA export.
The 2001 Airlie Nuclear Transport Meeting, Airlie/USA

Windgassen M, Krebber H (2003)

Involvement of shuttling SR-proteins in the export of messenger RNAs in yeast.
EMBO workshop on Mechanisms of Nuclear Transport, Taormina/Italien

Marburg, den 03.09.2004

Merle Windgassen